

Aus der Medizinischen Klinik

und Poliklinik III

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

CD 33 in der akuten myeloischen Leukämie: Validierung des  
Targetantigens und funktionelle Charakterisierung eines  
bispezifischen CD33-CD3 Antikörper

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Jan Lukas Bögeholz

aus

Recklinghausen

Jahr

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Marion Subklewe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dreyling  
Prof. Dr. med. Marcus Hentrich

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2017

*„Weise sind alle die, die sowohl die Notwendigkeit wie die Grenzen des Wissens erkennen und die verstehen, dass Liebe größer als Wissen ist.“*

(Paul Tillich)

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1. DIE AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE</b>	<b>1</b>
1.1. KLINIK UND EINTEILUNG	1
1.2. ELN KLASSIFIKATION	3
1.2.1. ELN „favorable“ (günstig)	4
1.2.2. ELN „Intermediate“ (Intermediär)	5
1.2.3. ELN „Adverse“ (Ungünstig)	5
1.3. MRC KLASSIFIKATION	6
<b>2. CD33</b>	<b>8</b>
2.1. DAS ZIELANTIGEN CD33	8
2.2. CD33 IN PHYSIOLOGISCHER UND MALIGNER HÄMATOPOESE	9
<b>3. CD33 GERICHTETE ANTIKÖRPER THERAPIEN: GEMTUZUMAB OZOGAMICIN</b>	<b>10</b>
<b>4. BiTE®-TECHNOLOGIE</b>	<b>12</b>
4.1. DER CD19/CD3 BiTE® ANTIKÖRPER BLINATUMOMAB	13
4.2. DER CD33/CD3 BiTE® ANTIKÖRPER AMG 330	14
<b>II. ZIELSETZUNG</b>	<b>15</b>
<b>III. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>16</b>
<b>1. MATERIAL</b>	<b>16</b>
1.1. BLUT UND KNOCHENMARKSPROBEN	16
1.2. ZELLINIEN	16
1.3. AMG 330 UND NEGATIVKONTROLLE	17
1.4. FARBKONJUGIERTE ANTIKÖRPER	18
1.5. KITS	19
1.6. CHEMIKALIEN	19
1.7. GERÄTE UND MATERIALIEN	21
1.8. COMPUTERPROGRAMME	22
<b>2. METHODEN</b>	<b>23</b>
2.1. ISOLIERUNG VON PERIPHEREN MONONUKLEÄREN ZELLEN AUS DEM VOLLBLUT (PBMC)	23
2.2. KYROKONSERVIERUNG UND AUFTAUEN VON PBMC	24
2.3. IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG	24
2.3.1. Durchflusszytometrie und Färbung	24
2.3.2. FACS-Analyse durch das Labor für Leukämiediagnostik	25
2.3.3. Gatingstrategie und Evaluierung der Oberflächenexpression (MFI-Ratio)	25

2.3.4. Bestimmung von CD34+/CD38- Zellen	27
2.4. EVALUIERUNG VON PROGNOSEFAKTOREN AUS DER ZENTRALEN DATENBANK IM LABOR FÜR LEUKÄMEDIAGNOSTIK	28
2.5. ZELLKULTUR	28
2.6. SEPERATION VON CD34+/LIN-ZELLEN FÜR DIE CFU ASSAYS	28
2.7. KOLONIEFORMIERENDE EINHEITEN	29
2.8. TITRATION DES E:T RATIOS FÜR AMG 330 ZYTOTOXIZITÄTSVERSUCHE	29
2.9. EXPRESSIONSABHÄNGIGE ZELLYSE VON AML ZELLEN DURCH AMG 330	30
2.10. STATISTISCHE ANALYSE	31
<b>IV. ERGEBNISSE:</b>	<b>33</b>
<b>1. CD33 EXPRESSIONSINTENSITÄT BEI AML ERSTDIAGNOSEN</b>	<b>33</b>
1.1. KORRELATION DER CD33 EXPRESSION ZUM FAB SUBTYP	35
1.2. ELN UND MRC KLASSIFIKATION	35
1.3. MOLEKULARE PROGNOSEFAKTOREN	38
1.4. ZYTOGENETISCHE PROGNOSEFAKTOREN	38
1.5. AKUTE PROMYELOZYTENLEUKÄMIE	41
<b>2. CD33 EXPRESSIONSINTENSITÄT AUF LEUKÄMIE INITIIERENDEN ZELLEN</b>	<b>42</b>
2.1. KOHORTE DER LIC AUSWERTUNG	42
2.2. GATINGSTRATEGIE UND DEFINITION VON LIC	43
2.3. EXPRESSIONSVERGLEICH VON AML- GESAMTTUMORMASSE UND LIC	45
2.4. EXPRESSION VON CD33 AUF GESUNDEN HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLEN	47
2.5. CD33 EXPRESSION AUF AML ZELLINIEN	48
<b>3. ZYTOTOXIZITÄT DES BISPEZIFISCHEN CD33/CD3 ANTIKÖRPER AMG 330</b>	<b>49</b>
3.1. AMG 330 MEDIERTE ZYTOTOXIZITÄT AUF AML ZELLINIEN	49
3.2. TOXIZITÄT AUF GESUNDE HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN	50
<b>4. KINETIK DER AMG 330 ANTIKÖRPERVERMITTELTEN ZYTOTOXIZITÄT VON AML ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT DER CD33 EXPRESSION</b>	<b>52</b>
<b>V. DISKUSSION</b>	<b>57</b>
<b>1. CD33 EXPRESSION</b>	<b>57</b>
1.1. CD33 EXPRESSIONSINTENSITÄT AUF AML	58
1.2. DIE KORRELATION ZWISCHEN EXPRESSIONSINTENSITÄT , PROGNOSEFAKTOREN UND KLINISCHEN ERGEBNISSEN	58
1.3. CD33 IN DER PROMYELOZYTENLEUKÄMIE (APL)	61
<b>2. ERFAHRUNGEN MIT CD33 ANTIKÖRPERN UND VORTEILE VON AMG 330</b>	<b>62</b>
<b>3. CD33 EXPRESSION AUF LEUKÄMIE INITIIERENDEN ZELLEN</b>	<b>64</b>

---

<b>4. TOXIZITÄT AUF GESUNDE HÄMATOPOETISCHE ZELLEN</b>	<b>66</b>
<b>5. BEVORZUGTE ZYTOTOXIZITÄT VON ZELLEN MIT HOHER CD33 EXPRESSION</b>	<b>67</b>
<b>6. CHANCEN UND HERAUSFORDERUNGEN VON UND MIT AMG 330</b>	<b>67</b>
6.1. UNGEWÜNSCHTE TOXIZITÄT	67
6.2. BEKANNT NEBENWIRKUNGEN VON BLINATUMOMAB	68
6.3. IMMUNSCHWÄCHENDE MECHANISMEN	69
6.4. THERAPIE UND ANWENDUNG	69
<b>7. AUSBLICK</b>	<b>70</b>
<b><u>VI. ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>72</u></b>
<b><u>VII. LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>74</u></b>
<b><u>VIII. ANHANG</u></b>	<b><u>88</u></b>
1. PUBLIKATIONEN	88
2. INTERESSENKONFLIKTE	88
<b><u>IX. DANKSAGUNG</u></b>	<b><u>89</u></b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ADCC	Antibody dependet cytotoxicity
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozytenleukämie
ATO	Arsentrioxid
ATRA	Retinsäurerezeptor $\alpha$
BiTE®	Bispecific T cell engager
C	Celsius
CAR	Chimeric antigen receptor
<i>CBF</i>	Core Binding Factor
<i>CBFB</i>	Cor binding factor Beta Subunit
CD	Cluster of differentiation
<i>CEPBA</i>	CCAAT/ enhancer-binding protein alpha Gen
CFU	Colony forming unit
CHO	Chinese Hamster ovary
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CR	Complete remission
CRp	Complete remission without platelet recovery
Del(X)	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E:T	Effektor- : Targetzelle
EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive Konzentration
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELN	European LeukemiaNet
EMA	European Medicines Agency
FAB	French-American-British
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc	Fragment crystallisable
FDA	Food and Drug Administration

FKS	Fetales Kälberserum
<i>FLT3</i>	FMS like tyrosinkinase
FSC	Forward scatter
GO	Gemtuzumab Ozogamicin
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
Ig(X)	Immunglobulin(Subklasse)
IgV	Immunoreceptor tyrosine-based inhibiton motif
Inv(x)	Inversion
ITD	Interne Tandemduplikation
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibiton motif
kD	Kilodalton
LFL	Labor für Leukämiediagnostik
LIC	Leukämie initiiierende Zelle
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LSC	Leukämische Stammzelle
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MACS	Magnetic cell seperation
MFI	Mean fluorescene intensity
mg	Milligramm
<i>MLL</i>	Mixed lineage leukemia
MRC	Medical Research Council
MRD	Minimal rest disease
MRP1	Multi drug resistance-associated protein 1
ng	Nanogramm
NK Zellen	Natürliche Killerzelle
NOD	Non-Obese Diabetic
<i>NPM</i>	Nucleophosmin
P-gp	Permeability glykoprotein
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PD-L1	Programmed cell death protein -Ligand 1



PD1	Programmed cell death protein
pH	Potential hydrogenii
<i>PML</i>	Promyelocytic leukemia Protein
r/r	Relapsed/Refractory
RAR $\alpha$	Retinsäurerezeptor $\alpha$
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
<i>RUNX</i>	Runt-related transcription factor
sAML	sekundäre akute myeloische Leukämie
scFv	Single chain variable fragment
SCID	Severe combined immunodeficiency
SHP	Src homology region 2 domain containing phosphatase
Siglec	Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin
SSC	Side scatter
T(x/x)	Translokation (x/x)
tAML	Therapiebedingte akute myeloische Leukämie
UK	United Kingdom
WHO	World Health Organisation

## **I. EINLEITUNG**

### **1. Die akute myeloische Leukämie**

#### **1.1. Klinik und Einteilung**

Mit einer Inzidenz von ca. 3-4 Fällen/100.000 Einwohnern /Jahr ist die akute myeloische Leukämie (AML) die vorherrschende akute Leukämie im Erwachsenenalter (Schlenk, Dohner et al. 2013). Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 60-70 Jahren (Estey and Dohner 2006). Klinische Symptome erklären sich durch die unkontrollierte Vermehrung eines unreifen myeloischen Klons im Knochenmark und die damit verbundene Verdrängung der normalen Blutbildung. Als Erstsymptome treten besonders Müdigkeit und verminderte Leistungsfähigkeit, Blutungsneigungen und eine erhöhte Neigung zu Infektionen auf. Laborchemisch zeigen sich dementsprechend Anämie, Thrombozytopenie und ein Mangel an funktionsfähigen Granulozyten.

Nachdem die AML jahrelang morphologisch und nach Peroxidase und Esterase-Verhalten in acht Untergruppen der French-American-British Klassifikation (FAB Klassifikation) eingeteilt wurde (Bennett, Catovsky et al. 1976), existiert aktuell zusätzlich die Klassifikation nach der World Health Organisation (WHO) mit der letzten Revidierung von 2009 (Vardiman, Harris et al. 2002, Vardiman, Thiele et al. 2009). Diese berücksichtigt bei zunehmend besserem Verständnis der molekularen Pathogenese zytogenetische, molekulargenetische und morphologische Veränderungen. Die verschiedenen Mutationen, die in den betroffenen Zellen akkumulieren, machen die AML zu einer heterogenen Erkrankung und verändern Proliferation und Differenzierung der Zellen (Schlenk, Dohner et al. 2013).

Bei einem Anteil von über 20 Prozent der myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark ist nach WHO-Klassifikation die Diagnose der AML zu stellen. Eine Ausnahme stellen dabei Leukämien mit Mutationen im Core Binding Factor (CBF) und akute Promyelozytenleukämien (APL) dar, bei denen eine niedrigere Anzahl von unreifen Zellen bei positivem Mutationsnachweis zur Diagnosestellung bereits ausreichend ist (Vardiman, Harris et al. 2002, Vardiman, Thiele et al. 2009).

Trotz einer hohen Ansprechrate von 65-75% nach den Standard-Induktionstherapien mit Anthrazyklinen und Cytarabine, kommt es bei vielen Patienten zum Rezidiv und damit zu einer insgesamt schlechten Prognose (Estey and Dohner 2006). Aktuell liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten unter 60 Jahren bei 35-40% und bei denjenigen über 60 Jahren nur bei 5-15 % (Dohner, Weisdorf et al. 2015).

Neben der höheren therapiebedingten Mortalität im Alter, unter anderem durch schlechteren Allgemeinzustand und Komorbiditäten verursacht (Giles, Borthakur et al. 2007), sind mit steigendem Alter diejenigen molekularen Mutationen häufiger, die mit einer schlechten Prognose assoziiert werden (Appelbaum, Gundacker et al. 2006). Eine schlechte Prognose wurde außerdem bei Patienten beobachtet, bei denen die AML aus vorherigen hämatologischen Erkrankungen (sAML) oder früheren Zytostatikatherapien (tAML) entstanden ist, und bei Patienten mit einer massiven Leukozytose über 100.000/ $\mu$ l (Dohner, Estey et al. 2010).

Bei einer erhöhten Risikokonstellation stellt die allogene Stammzelltransplantation die langfristig wirksamste Therapie gegen Rezidive und so einer langfristigen Überlebenswahrscheinlichkeit dar (Muller and Muller-Tidow 2015). Die hohe therapieassoziierte Mortalität, insbesondere bei älteren und mehrfach chronisch erkrankten Patienten, limitiert die Indikation für eine allogene Transplantation auf junge Patienten ohne schwere Komorbiditäten. Zusammengefasst unterstreicht die mangelnde Eignung vieler Patienten für intensive Therapien die Notwendigkeit neuer Therapiemöglichkeiten. (Schlenk, Dohner et al. 2013).

Es scheint lediglich eine kleine Zahl leukämischer Zellen klonale Eigenschaften zu besitzen, vergleichbar mit gesunden hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Diese werden als leukämie-initiiierende Zellen (LIC) bezeichnet, die aufgrund ihrer Resistenz gegen Chemotherapeutika und der Fähigkeit zur Selbsterneuerung als ursächlich für die hohe Rezidivrate gesehen werden (Dick 2008). Basierend auf Modellen mit severe combined immunodeficiency (SCID) Mäusen, vermutet man die Population dieser sogenannten leukämischen Stammzellen (LSC), bzw. Leukämie initiiierende Zellen (LIC) vor allem im Kompartiment der CD34 positiven und CD38 negativen Zellen (CD34+/CD38- Zellen). Eine Voraussetzung für die Verringerung der hohen Rezidivrate wäre demnach eine

effiziente Therapie gegen LSC/LIC.

Ein bedeutender Prädiktor für Ansprechen und nachhaltigen Therapieerfolg der Induktionstherapie stellt der fehlende Nachweis von restlichen Leukämiezellen, sogenannte „minimal rest disease“ (MRD) dar. Mittels verschiedener, sehr sensitiver Messmethoden wie Echtzeit Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) von definierten Fusionsgenen oder Durchflusszytometrie von individuellen leukämietypischen Konstellationen der Oberflächenantigene gelingt ein Nachweis bereits in Bereichen von  $10^{-4}$  bis  $10^{-5}$  Zellen (Kohnke, Sauter et al. 2015). Für viele AML Patienten existieren mittlerweile MRD Assays, die eine wichtige prognostische Vorhersagekraft besitzen und entscheidende Einflüsse in Therapieentscheidungen, bis hin zur Transplantationsindikation, haben (Burke 2016) (Appelbaum 2015, Ivey, Hills et al. 2016).

In diesem Kontext stellen die verschiedenen Ansätze der Immuntherapie vielversprechende Behandlungsformen dar. Gemeinsam ist diesen innovativen Therapien, dass das vorhandene Immunsystem ausgenutzt wird, um endogene Effektorzellen spezifisch gegen Tumorzellen zu richten. Bisherige klinische und präklinische Studien von Toxin-konjugierten monoklonalen Antikörpern, „T-cell engaging antibody constructs“, dem adaptiven Transfer von „chimeric antigen receptor „(CAR) T Zellen und der Vakzinierung von dendritischen Zellen zeigten bereits viele positive Ergebnisse (Lichtenegger, Krupka et al. 2015). In den Immuntherapien könnten in Zukunft also neue und effektive Alternativen bei Versagen der konventionellen Therapien liegen.

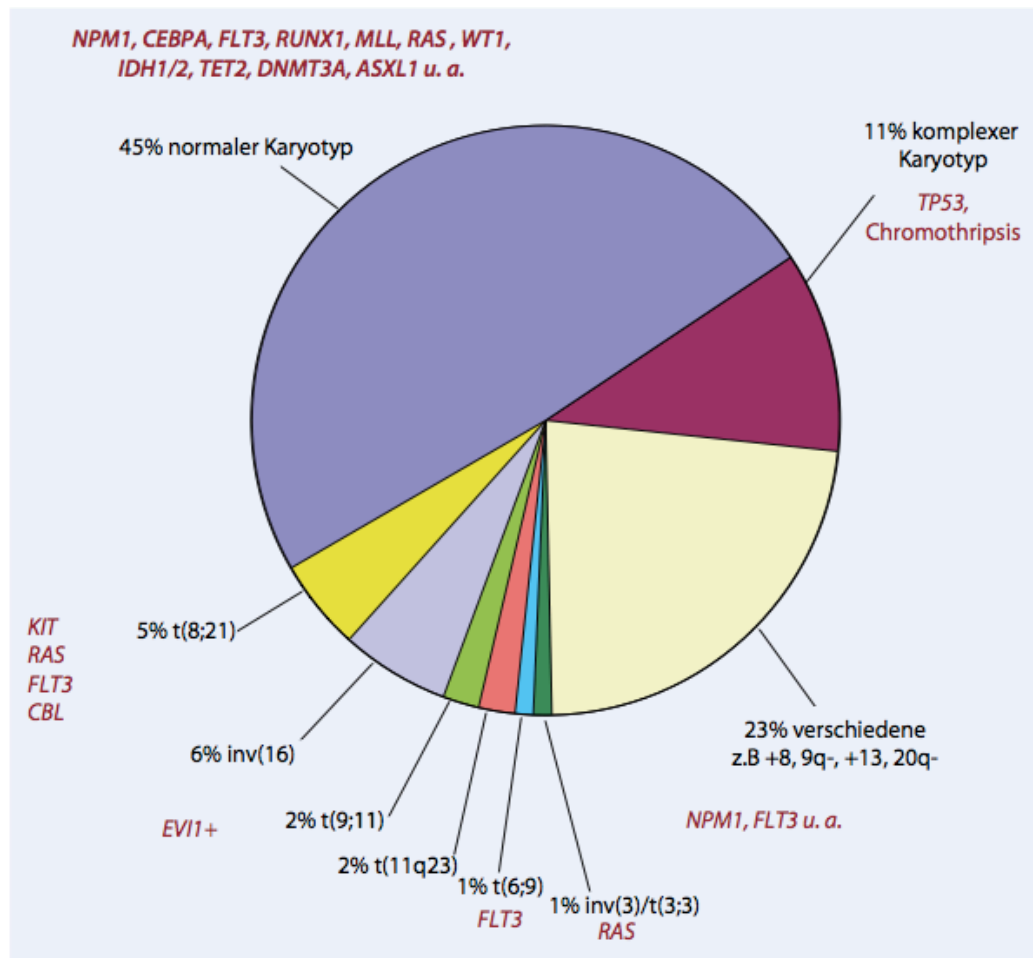
## **1.2. ELN Klassifikation**

Im Jahr 2010 wurden von einem internationalen Expertengremium des European LeukemiaNet (ELN) Empfehlungen zur Diagnose und Management bei erwachsenen Patienten mit AML veröffentlicht (Dohner, Estey et al. 2010). Dabei sind zytogenetische und molekulare Faktoren anhand einer Risikoeinteilung vier Subgruppen zugeordnet worden (siehe Tabelle 1).

Bei 59% der erwachsenen AML Patienten werden chromosomale Veränderungen nachgewiesen (Grimwade 2001, Grimwade, Hills et al. 2010). Der Karyotyp der leukämischen Zellen ist dabei einer der stärksten prognostischen Faktoren für Therapieerfolg und Überleben (Grimwade 2012).

### 1.2.1. ELN „favorable“ (günstig)

Zu den sogenannten CBF Leukämien werden leukämische Zellen mit einer Inversion am Chromosom 16 (Inv(16)), einer Translokation 16 (t(16;16)) oder t(8,21) mit deren Fusionsprodukten *RUNX1-RUNX1T1* und *CBFB-MYH11*



**Abbildung 1: Verteilung der Zytogenetik bei AML Patienten (schwarze Schrift). In roter Schrift sind heterogene Mutationen mit Assoziation zu den angegebenen zytogenetischen Veränderungen aufgeführt, aus (Schlenk, Dohner et al. 2013).**

gezählt. Leukämien mit diesen balancierten Rearrangements, also ohne Verlust eines Chromosoms oder Chromosomenabschnitts, werden mit einer günstigen Prognose klassifiziert. Für die akute Promyelozytenleukämie (APL) mit der balancierten Translokation t(15;17) und zugehöriger *PML-RARA* Fusion gelten zudem gesonderte Therapieempfehlungen. Sie zählt ebenfalls zu den Leukämien

mit günstiger Prognose.

Mutationen im *NPM1*-Gen führen zu einer aberranten zytoplasmatischen Lokalisation des Nucleophosmin (*NPM1+*) (Falini, Mecucci et al. 2005). Zusammen mit einem normalen Karyotyp und ohne interne Tandemduplikation der Tyrosinkinase *FLT3* (*FLT3-ITD*) werden sie als molekulare Marker mit günstiger Prognose beschrieben. Dies gilt auch für biallelische Mutationen des *CCAAT/enhancer-binding protein alpha Gen* (*CEBPa*) bei normalen Karyotyp.

Die Standardtherapie für Patienten mit günstigem Risikoprofil beinhaltet wenn möglich eine Therapie mit klassischen Chemotherapeutika. Nach der Induktionstherapie folgt eine Konsolidierungstherapie und darauffolgend eine Erhaltungstherapie.

### **1.2.2. ELN „Intermediate“ (Intermediär)**

Die meisten AML Patienten der intermediären Gruppen weisen einen normalen Karyotyp auf. Auch wenn eine *FLT3-ITD* prinzipiell als ungünstig gilt (Kiyoi and Naoe 2002), werden Leukämien mit normalen Karyotyp in Kombination mit *FLT3-ITD* als Intermediär 1 klassifiziert. Eine zusätzliche *NPM1* Mutation oder das Fehlen beider Mutationen bei normalen Karyotyp fällt ebenso in diese Klasse.

Chromosomale Veränderungen, deren prognostische Signifikanz noch unklar ist und *t(9;11)(p22;q23)* (*MLL* (*Mixed Lineage Leukemia Gen*) Rearrangement) werden als Intermediär II klassifiziert. Zwischen den beiden intermediären Untergruppen konnte kein Unterschied im Gesamtüberleben gezeigt werden (Alpermann, Kern et al. 2013). Es werden somit AML mit und ohne zytogenetische Veränderungen innerhalb der Gruppe von Patienten mit intermediärer Prognose noch einmal zusätzlich unterschieden.

Alle Patienten der intermediären Risikogruppe, die das Anforderungsprofil einer allogenen Blutstammzelltransplantation erfüllen, erhalten gewöhnlich die Empfehlung für eine allogene Transplantation.

### **1.2.3. ELN „Adverse“ (Ungünstig)**

Als prognostisch ungünstig zählen unbalancierte Veränderungen an den Chromosomen 3, 5 und 7. Ein komplexer Karyotyp nach ELN-Klassifikation ist definiert als das Vorhandensein von drei oder mehr Veränderungen in Abwesenheit von balancierten Veränderungen und ist neben der Translokation

t(6;9) und Rearrangments des *MLL-Gens* (mit Ausnahme von t(9;11)(p22;q23)) ein Kriterium für die Klassifizierung in die ungünstige Gruppe.

Für die Patienten der ungünstigen Gruppe besteht, sofern möglich, immer die Indikation für eine allogene Stammzelltransplantation.

### Genetische Gruppe    Untergruppen

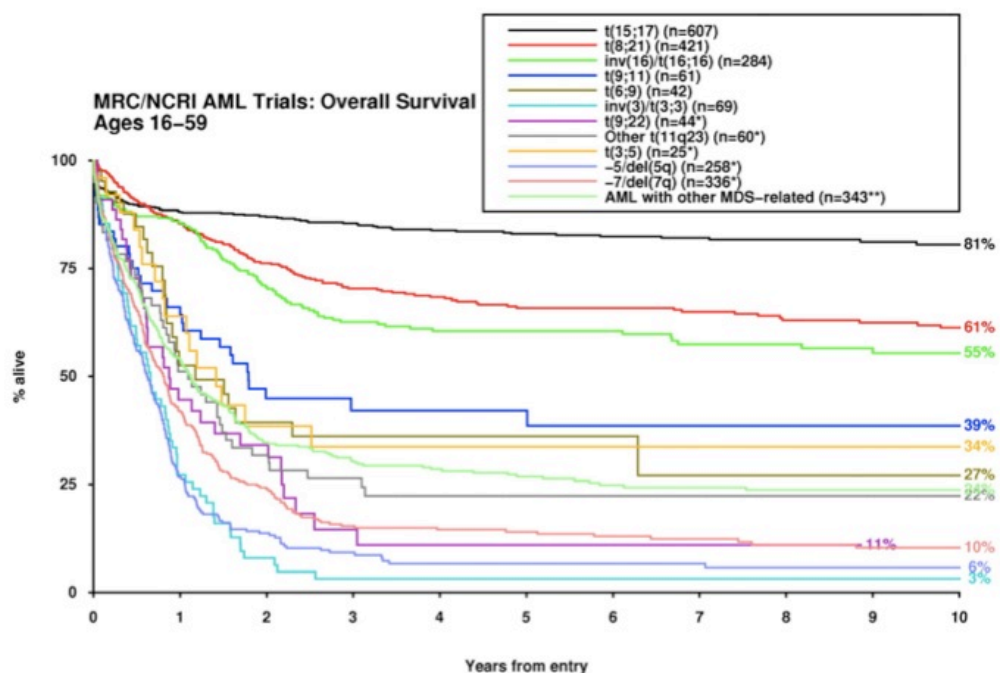
Günstig	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 Mutiertes NPM1 ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp) Mutiertes CEBPA (normaler Karyotyp)	a) Beinhaltet alle akuten myeloischen Leukämien mit normalem Karyotyp; ausgenommen sind Formen mit günstigem Risiko b) Für die meisten dieser Veränderungen liegen zu kleine Fallzahlen vor, um belastbare Aussagen zur Prognose machen zu können. c) $\geq 3$ Veränderungen in der Abwesenheit der balancierten Veränderungen
Intermediär I(a)	Wildtyp-NPM1 und FLT3-ITD (normaler Karyotyp) Wildtyp-NPM1 ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp)	Veränderungen t(15;17), t(8;21), inv(16) oder t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) oder t(3;3) (Dohner, Estey et al. 2010)
Intermediär II	t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL Chromosomale Veränderungen nicht als günstig oder ungünstig klassifiziert (b)	
Ungünstig	inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23); MLL rearrangiert -5 oder del(5q); -7; abnl(17p); komplexer Karyotyp(c)	

**Tabelle 1: Risikoeinteilung nach der ELN-Klassifikation**

### 1.3. MRC Klassifikation

Anhand von 5876 Patienten wurden in den „United Kingdom Medical Research Council (MRC) trials“ Unterschiede im Überleben von 54 zytogenetischen Subgruppen evaluiert (Grimwade, Hills et al. 2010). Dies hat zu einer Einteilung in 3 Prognosegruppen (favorable, intermediate, adverse) geführt. Im Gegensatz zur ELN Klassifikation wurden in dieser Klassifikation alle AML mit normalen Karyotyp als eine homogene Gruppe betrachtet und keine Unterscheidung der molekularen Risikofaktoren durchgeführt. Für die drei balancierten Chromosomenaberrationen, die in der ELN-Klassifikation als günstig klassifiziert werden, wurde ein signifikanter Überlebensvorteil gezeigt. Daher gelten sie auch in der aktuellen MRC Klassifikation von 2010 als günstiger Prognosefaktor. Zu

der Gruppe mit intermediärer Prognose werden alle Patienten gezählt, die weder als günstig noch als ungünstig klassifiziert werden. Die ungünstigen Veränderungen des Karyotyp umfassen, vergleichbar der ungünstigen ELN-Gruppe, vollständige Verluste der Chromosomen 3,5 und 7, Inversionen dieser Chromosomen, Abnormitäten im Chromosom 3 und t(3;3), Deletionen des Chromosoms 5 und 7 sowie Abnormitäten und der Verlust von Chromosom 17. Veränderungen in der Region des *MLL* Gens werden wie in der ELN-Klassifikation als ungünstig klassifiziert, mit Ausnahmen von t(9;11)(p21 22;q23) und t(11;19)(q23;p13). Bei nicht ausreichender Fallzahl der Studie wird eine t(6;9) trotz vernehmbarer Tendenz nicht als ungünstig gewertet. Stattdessen wird in der MRC Klassifikation zusätzlich t(9;22)(q34;q11) mit dem entstandenen *BCR-ABL*-Gen als ungünstig klassifiziert. Vier nicht verwandte Abnormitäten definieren in der MRC Klassifikation einen komplexen Karyotyp und zeigen ein signifikant deutlich schlechteres Gesamtüberleben (Grimwade, Hills et al. 2010).



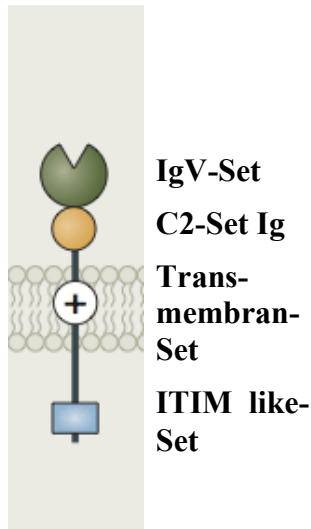
**Abbildung 2: Gesamtüberlebensraten von jüngeren AML Patienten anhand zytogenetischer Aberrationen. \*ausgeschlossen inv(16), t(8;21), t(15;17), t(9;11), t(6;9), inv(3)/t(3;3)\*\*ausgeschlossen Patienten mit vorher beschriebenen Mutationen. Abbildung aus (Grimwade, Hills et al. 2010)**



## 2. CD33

### 2.1. Das Zielantigen CD33

Der 65kD Rezeptor CD33 gehört zur Familie der sialic acid-binding immunoglobulin (Ig)-like lectins (Siglec), wird auch als Siglec-3 bezeichnet und zählt zu den Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie. Das CD33 Gen befindet sich auf Chromosom 19q13.3, die Regulation ist bisher unklar



**Abbildung 3: Die verschiedenen Domänen (Sets) des Siglec-3 Rezeptors (CD33) aus (Crocker, Paulson et al. 2007)**

(Linenberger 2005). CD33 besteht aus zwei extrazellulären Domänen: IgV variable set domain und einem C2 Set Ig, sowie zusätzlich einer Transmembran- und einer intrazellulären Domäne (siehe Abbildung 3). IgV erkennt Sialinsäuren, wichtige Aminosäuren bei Zell-Zell-Interaktionen.

Die starke Expression von CD33 auf myeloischen Vorläuferzellen lässt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von myeloischen Zellen vermuten (Crocker, Paulson et al. 2007). Wie die anderen Rezeptoren der CD33 verwandten Siglecs besitzt CD33 in der zytoplasmatischen Domäne Immuno-receptor tyrosine-based inhibitory motif like (ITIM) Sequenzen, welche CD33 die Funktion eines hemmenden Rezeptors verleihen und so über eine Runterregulierung von intrazellulären Signalwegen

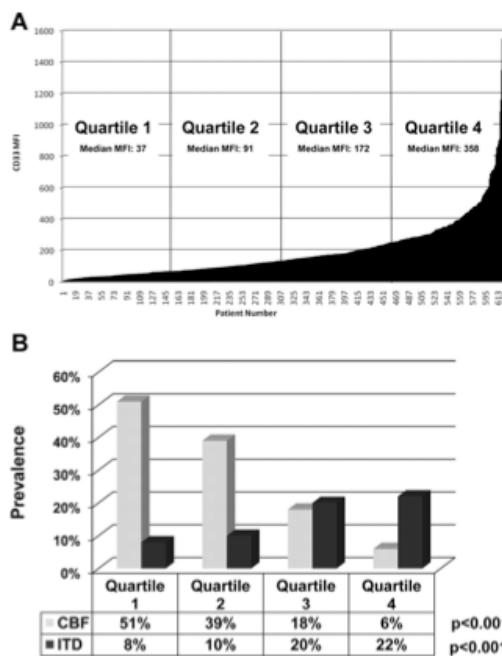
Beiträge zur Steuerung von immunologischen Prozessen liefern könnten (Perez-Oliva, Martinez-Esparza et al. 2011). Phosphoryliertes CD33 rekrutiert die Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 und agiert als inhibitorischer Rezeptor bei Ligandenbindung (Taylor, Buckley et al. 1999). Sialinsäuren sind ubiquitär exprimiert und CD33 hat somit vermutlich einen protektiven Effekt vor autoimmunologischen Reaktionen wie Allergien (Zhang, Angata et al. 2007). Die Rolle von Sialinsäuren auf Pathogenen scheint hingegen komplex. Einerseits können auf der Zelloberfläche integrierte Sialinsäuren von Abwehrzellen erkannt werden. Andererseits haben Pathogene die hemmende Funktion der Sialinsäurerezeptoren mit ITIM Funktionen als einen Virulenzmechanismus zur Unterwanderung des Immunsystems integriert (Chang and Nizet 2014, Bochner and Zimmermann 2015). Letztlich bleibt aber die genaue Rolle von CD33 bisher

nicht vollständig verstanden (Cowan, Laszlo et al. 2013).

Wenn monoklonale Antikörper an CD33 binden, wird der Rezeptor langsam mit dem Antikörper internalisiert. Verantwortlich dafür scheint die intrazelluläre Domäne mit den ITIM-Sequenzen zu sein (Walter, Raden et al. 2008).

## 2.2. CD33 in physiologischer und maligner Hämatopoese

CD33 kommt neben leukämischen auch auf gesunden myeloischen Zellen vor. Im Gegensatz zu Granulozyten exprimieren Monozyten CD33 mit einer hohen Intensität. Frühe Vorläuferzellen sowie lymphatische Zellen exprimieren dagegen meist kein CD33 auf ihrer Oberfläche (Dinndorf, Andrews et al. 1986). CD33 wurde erstmals in einem Panel mit monoklonalen Antikörpern auf humanen



**Abbildung 4: Bei der kindlichen AML war eine hohe CD33 Expression mit FLT3-ITD, eine niedrige Expression mit CBF Mutationen assoziiert** (Pollard, Alonzo et al. 2012).

myeloischen Zellen nachgewiesen (Andrews, Torok-Storb et al. 1983). Die Expression von CD33 spielt eine wichtige Rolle in der Immundiagnostik von myeloischen Neoplasien, speziell in der Abgrenzung zu Erkrankungen der lymphatischen Reihe.

CD33 findet sich auf 85-90% der kindlichen und erwachsenen AML, definiert als das Vorhandensein von CD33 auf mehr als 20% der myeloischen Blasten (Dinndorf, Andrews et al. 1986, Bene, Castoldi et al. 1995). Die Anzahl an CD33 Molekülen pro AML Zelle ist höher als bei anderen myeloischen Erkrankungen (Jilani, Estey et al.

2002). Im Kompartiment CD34+/CD38-CD123+, also im Kompartiment der sogenannten Leukämie initiiierenden Zellen (LIC), konnte CD33 ebenfalls nachgewiesen werden (Hauswirth, Florian et al. 2007). Bei der kindlichen AML konnte bei 619 Kindern eine hohe CD33 Expression als unabhängig-signifikanter Prädiktor für Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben bestimmt werden.

Eine hohe Expression war außerdem mit *FLT3-ITD* und umgekehrt proportional mit Mutationen des CBF assoziiert (Pollard, Alonzo et al. 2012). Des Weiteren wurde für die AML bei Erwachsenen eine signifikant erhöhte CD33 Expression bei einer aberranten Lokalisation des *NPM1* Protein nachgewiesen. (De Propriis, Raponi et al. 2011). Allerdings war die untersuchte Gruppe mit nur 99 berücksichtigten Patienten eher klein und es wurde in dieser Untersuchung kein Bezug zur Kombination von *NPM1* mutierten AML mit anderen krankheitsspezifischen Mutationen gelegt.

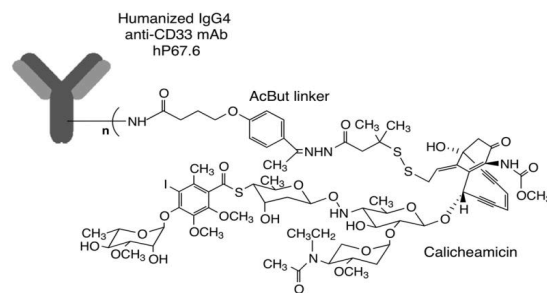
### 3. CD33 gerichtete Antikörper Therapien: Gemtuzumab Ozogamicin

Durch die starke Expression von CD33 in der AML wurden CD33 gerichtete Immuntherapien in der AML entwickelt. Der klinisch am weitesten fortgeschrittene CD33 Antikörper ist Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg®)(GO). Der humane

rekombinante IgG4 Antikörper ist über eine Linkersequenz mit dem Toxin Calcheamicin verknüpft.

Nach bivalenter Bindung wird der CD33 Rezeptor gemeinsam mit dem Antikörper internalisiert. Ist

die Verbindung des Antikörper-Toxin Konjugats im neutralen pH-Bereich noch stabil und in der gebundenen Form kaum toxisch, so ändert sich dies nach Abspaltung



**Abbildung 5: Der humane Antikörper GO ist über eine Linkersequenz mit dem Toxin Calcheamicin verbunden. Internalisiert führt das Toxin zu Doppelstrangbrüchen der DNA in CD33 positiven Zellen. Abbildung aus (Cowan, Laszlo et al. 2013).**

im sauren Milieu des Lysosoms. Das freie Calcheamicin bindet an die kleine Furche der Desoxyribonukleinsäure (DNA), und es kommt zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen, die schließlich zur Apoptose der Zelle führen. GO wurde im Jahr 2000 von der United States Food and Drug Administration (FDA) in einem beschleunigten Verfahren für die Behandlung von Patienten über 60 Jahren im ersten Rezidiv zugelassen, die für die Standardtherapie nicht in Frage kamen. In der Zulassungsstudie mit nur einem Studienarm wurden 142 Patienten im ersten Rezidiv untersucht, die 9 mg/m<sup>2</sup> GO über vier Stunden, meist mit einer

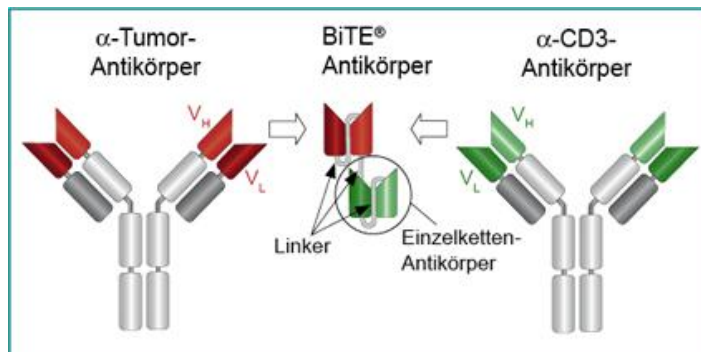
zweiten Applikation nach 14 Tagen, erhalten haben. 16 % der Patienten erreichten eine komplette Remission (CR), bei weiteren 13% regenerierte sich die Anzahl der Thrombozyten verlangsamt (CRp). Das zuständige Komitee einigte sich daraufhin auf eine Ansprechrate von insgesamt 30% (Bross, Beitz et al. 2001). Im Juli 2010 wurde GO nachdem vorzeitigen Abbruch einer klinischen Studie wieder vom Markt genommen. Es wurde kein Vorteil zur standardmäßigen Induktionstherapie bei einer erhöhten Rate an Nebenwirkungen beobachtet (Petersdorf, Kopecky et al. 2013). Einige Aspekte standen nach dem Studienabbruch allerdings in der Kritik. Zwischen verschiedenen AML Subgruppen wurde in der Studie dabei nicht unterschieden, was den positiven Effekt von GO in einigen Subgruppen maskiert haben könnte (Lichtenegger, Schnorfeil et al. 2013). Des Weiteren bekamen die Studienpatienten der GO Gruppe eine niedrigere Konzentration der Standardzytostatika, um Zytotoxizitäten auszugleichen, was ebenfalls ein potentiell positives Ansprechen von GO maskiert haben könnte.

Eine Therapie mit niedrigeren Dosierungen und häufigerer Gabe, fraktioniert mit Dosierungen von  $3\text{mg/m}^2$  an den Tagen 1,4 und 7, scheint sich besser der Dynamik des internalisierenden Rezeptors anzupassen und zeigte in klinischen Studien ein gutes Effektivitäts- und Sicherheitsprofil (Farhat, Reman et al. 2012). Die Therapie mit dem angepasstem Schema zeigte einen Vorteil im Gesamtüberleben, Rezidiv-freien Überleben und Ereignis-freien Überleben gegenüber dem Standardregimen (Castaigne, Pautas et al. 2012). Interessanterweise zeigten einige klinische Studien zwar keinen oder nur geringen Vorteil von GO für die gesamten Studienpopulationen, wohl aber für die Subgruppen mit günstiger Prognose und einigen Patienten mit mittlerer Prognose (Burnett, Hills et al. 2011, Burnett, Russell et al. 2012, Castaigne, Pautas et al. 2012). In der separat betrachteten Entität von Kindern mit AML und einem MRD positiven Status, war GO alleine oder in Kombination mit der Standardtherapie in der Lage, die MRD Level effektiv zu reduzieren (O'Hear, Inaba et al. 2013). In einer Metanalyse mit fünf untersuchten klinischen Studien und insgesamt 3325 Patienten, konnte ein suffizientes Sicherheitsprofil und ein Vorteil von GO zur Standardchemotherapie für Patienten mit günstigen oder intermediären Risikoprofil gezeigt werden (Hills, Castaigne et al. 2014).

#### 4. BiTE®-Technologie

In den letzten Jahren wurden zahlreiche immuntherapeutische Therapien als Alternativen zu den herkömmlichen Zytostatikatherapien entwickelt. In der Konfrontation von malignen Zellen mit dem Immunsystem kommt es zu einem Prozess, der als Tumorediting bezeichnet wird. Dabei führen Veränderungen des malignen Klons zur Ausbildung sogenannter „Immune escape“ Mechanismen, die Immunantworten unterdrücken und die Tumorzellen für das Immunsystem quasi „unsichtbar“ werden lassen. (Kozłowska, Mackiewicz et al. 2013). Für eine adäquate Immunantwort durch spezifische T-Zellklone ist jedoch der komplizierte Prozess der spezifischen Antigen-Erkennung, Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen dringend erforderlich.

Mit der Entwicklung von Antikörperkonstrukten namens Bispecific T cell engager (BiTE®) entstand die Hoffnung, bald ein Therapeutikum anwenden zu können, dessen Aktivität nicht abhängig von der spezifischen Aktivierung eines T-Zellklons durch Antigenpräsentation und somit weniger empfindlich gegen Tumor-Escape-Mechanismen ist (Mack, Riethmüller et al. 1995).



**Abbildung 6: Der BiTE® besteht aus einer Tandem-Einzel-Kette. Dabei wurden die variablen Ketten eines IgG Antikörper mit einem Linker verbunden. Ein Terminus bindet an das Tumorantigen, der andere an CD3ε auf T-Zellen**  
Abbildung aus (D. Rüttinger 2008).

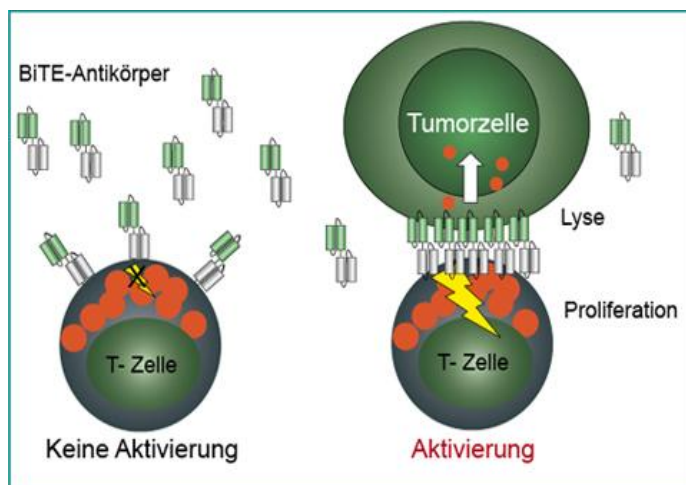
BiTE® Antikörper sind bispezifische Konstrukte, bestehend aus sogenannten „single chain variable fragment“ (scFv), die durch einen kurzen Polypeptidlinker miteinander verbunden sind. Der C-Terminus des Konstrukts ist spezifisch für humanes CD3ε, während der N-

Terminus spezifisch für ein Antigen auf der Zielzelle (Targetzelle) ist. Typischerweise werden BiTEs® mittels rekombinanter DNA Technologie aus CHO Zellen hergestellt (Baeuerle and Reinhardt 2009). Durch monovalente Bindung des BiTEs® Antikörpers an CD3ε und gleichzeitiger Bindung des Tumorzellantigens kann eine zytotoxische T-Zellantwort bereits bei einer niedrigen Effektor zu Targetzell Ratio (E:T Ratio) ausgelöst werden (Mack,

Riethmuller et al. 1995). Die Verlinkung beider Zellen führt über Ausschüttung von Perforinen und Granzyme B der gebundenen T-Zellen zur Zelllyse der betroffenen Tumorzellen. Dabei kann die Bindung funktionell die übliche T-Zellantwort, bestehend aus T-Zellrezeptor, Proteinantigen und MHC-Molekül, ersetzen (Offner, Hofmeister et al. 2006).

#### 4.1. Der CD19/CD3 BiTE® Antikörper Blinatumomab

Das klinisch am weitesten fortgeschrittene BiTE® Konstrukt ist Blinatumomab, dessen N-terminal an das auf B Zellen ubiquitär exprimierte Antigen CD19 bindet. Für Patienten mit B-Zell Lymphomen und akuten lymphoblastären Leukämien (ALL) zeigte sich eine hohe Effektivität sowohl in verschiedenen Krankheitsstadien, wie auch an verschiedenen Lokalisationen, einschließlich des Knochenmarks und der Lymphknoten. Bei Patienten mit hohen Tumormassen im Rezidiv oder bei refraktärer Erkrankung wurden allerdings unerwünschte Nebenwirkungen in Folge einer starken Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine durch aktivierte T-Lymphozyten beobachtet. Zur Vermeidung der



**Abbildung 7: Nach gleichzeitiger Bindung des BiTE® an Tumorzelle und T-Zelle kommt es zur Lyse durch Ausschüttung von Perforinen und Granzyme B aus der aktivierten T-Zelle** Abbildung aus (D. Rüttinger 2008).

Nebenwirkungen scheint eine jeweilige Dosisanpassung an die Erkrankung, das Erkrankungsstadium und in einigen Fällen eine zusätzliche Gabe von Steroiden erforderlich zu sein (Nagorsen, Kufer et al. 2012). Nachdem in einer Phase 2 Studie bei 189 Patienten mit refraktärer oder

rezidivierter ALL (r/r) eine Remissionsrate von insgesamt von 43% gezeigt werden konnte, wurde Blinatumomab im Dezember 2014 in einem beschleunigten Verfahren für die Philadelphia-Chromosom negative akute lymphoblastäre Leukämie in r/r zugelassen (Topp, Gokbuget et al. 2014, Topp, Gokbuget et al. 2015).

#### **4.2. Der CD33/CD3 BiTE® Antikörper AMG 330**

Auch in der AML wurde mit AMG 330 ein BiTE® Konstrukt entwickelt, das humanes CD33 bindet. In präklinischen Studien konnte bereits eine starke, von der Konzentration abhängige Zytotoxizität von AMG 330 gegen AML Zelllinien gezeigt werden. Auch in primären AML Zellkulturen wurde eine komplette Eliminierung von AML Zellen durch AMG 330 aktivierte und expandierte autologe residuale T Zellen in niedrigen Effektor zu Target Zell-Ratios (E:T Ratios) nachgewiesen (Krupka, Kufer et al. 2014). Auch im NOD/SCID Mausmodell mit humanen Spender-T-Zellen und einer AML Zelllinie konnte eine Hemmung des Tumorwachstums nach dosisabhängiger Gabe des BiTE® beobachtet werden (Aigner, Feulner et al. 2013, Friedrich, Henn et al. 2014). Die Dynamik des bispezifischen Antikörpers könnte dabei von bestimmten Faktoren, u.a. die Präsenz des Zielantigens auf AML Zellen, abhängen. Dies ist deswegen von besonderer Bedeutung, da CD33 auch auf physiologisch-vorkommenden myeloischen Zellen, u.a. neutrophilen Granulozyten, exprimiert wird und damit im Gegensatz zu Blinatumomab gegen Abwehrzellen gerichtet ist, bei denen nur eine kurzzeitige Absenz ohne lebensgefährliche Komplikationen toleriert werden kann. Für einen langfristigen Therapieerfolg muss die Exposition des Antikörpers zu einer effektiven Zelllyse von LIC führen und dabei die gesunden Stammzellen (HSC) aussparen. Einen wichtigen Einfluss könnte in diesem Kontext die quantitative Anzahl von CD33 Molekülen auf der Oberfläche der Zellen haben. Die biologische Heterogenität der Erkrankung könnte ferner einen Unterschied in den verschiedenen AML Subgruppen haben und ein individuelles Therapiekonzept mit AMG 330 für den jeweiligen Patienten bedeuten.

## II. ZIELSETZUNG

Die Komplexität molekularer und zytogenetischer Faktoren in der Pathogenese der AML führen zu einer heterogenen Erkrankung mit unterschiedlichen Prognosen. Die Identifikation prädiktiver Marker des jeweiligen Therapieansprechens ist daher Voraussetzung zur Entwicklung individueller Behandlungsstrategien im Sinne einer personalisierten Medizin. Bisherige Studien mit Anti CD33 Antikörpern zeigten, dass bestimmte Subgruppen mehr profitieren als andere. Unvollständig geklärt ist dabei die Frage, ob die Ansprechrate dieser Immuntherapie abhängig von der Expression des Zielantigens CD33 ist. Dafür wurde in dieser Arbeit die Expressionsintensität von CD33 auf AML Zellen bestimmt und mit charakteristischen molekularen und zytogenetischen Prognosefaktoren sowie Klassifikationssystemen korreliert.

Die mangelnde Fähigkeit der Eliminierung von Leukämie initiiierenden Zellen (LIC), welche, vergleichbar mit gesunden hämatopoetischen Stammzellen, besonders im Kompartiment der CD34+/CD38- Zellen vermutet werden, wird häufig als Ursache für die hohe Rezidivrate der AML gesehen. Die CD33 Expression auf CD34+/CD38- Zellen wird dafür mit der Gesamtheit von AML Zellen (Bulk) und, um die ungewünschte Toxizität zu untersuchen, mit den CD34+/CD38- Zellen von gesunden Knochenmarksspendern verglichen. Zudem wird mittels „Colony forming unit Experimenten“ (CFU-Assay) die Toxizität des bispezifischen CD 33- CD3 Antikörper AMG 330 auf gesunden Linienmarker-negativen Knochenmarkzellen betrachtet.

Der Einfluss der Expression auf die Kinetik des bispezifischen Antikörpers wird in *in vitro* Zellkulturen mit AML Zelllinien und PBMC von gesunden Spendern untersucht. Zunächst wird das zur effektiven AMG 330 vermittelten Zelllyse von AML Zellen benötigte E:T Verhältnis ermittelt. Weiter soll in einer Kokultur evaluiert werden, ob in der Anwesenheit von AMG 330 hoch exprimierende AML Zellen im Vergleich zu niedrig exprimierenden AML Zellen präferentiell eliminiert werden. Dazu wird eine Zelllinie MV4-11 mit hoher CD33 Expression und die Zelllinie OCI-AML3 mit niedriger CD33 Expression in einer Kokultur mit AMG 330 und PBMC von gesunden Spendern in verschiedenen E:T Ratios inkubiert und zu festgelegten zeitlichen Abständen untersucht.



### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Material

##### 1.1. Blut und Knochenmarksproben

Bei allen Patientenproben handelt es sich um Knochenmarks- oder Vollblutspenden von Patienten, die sich stationär in der Medizinischen Klinik III des Klinikum Großhadern befanden oder Proben, die dem Labor für Leukämiediagnostik von extern zugesandt wurden. Die Proben der gesunden Knochenmarksspender stammten ebenfalls aus dem Klinikum Großhadern. Sowohl Patienten als auch gesunde Spender haben ihr schriftliches Einverständnis vor der Probenentnahme abgegeben. Übereinstimmungen mit der Deklaration von Helsinki und eine Zustimmung des Ethikrates der LMU München lagen vor.

##### 1.2. Zelllinien

Alle Zelllinien stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig. Bei OCI AML-3 (ACC-582), Kasumi (ACC-220), MV4-11 (ACC-102), NB4 (ACC-207), PL21 (ACC-536), Molm13 (ACC-554) und HL60 (ACC-3) handelt es sich um etablierte Zelllinien von Patienten mit AML (siehe Tabelle).

<b>Zelllinie</b>	<b>Spender- alter</b>	<b>Spender- geschlecht</b>	<b>FAB- Subtyp</b>	<b>Mutationen</b>
<b>OCI-AML3</b>	57	M	M4	NPM1 mutiert , DNMT3A R882C mutiert
<b>MV4-11</b>	10	M	M5	FLT3-ITD, t(4/11), MLL-AF4 Fusionsgen
<b>NB4</b>	23	W	M3	t(15/17)
<b>PL21</b>	24	M	M3	FLT3-ITD
<b>Molm13</b>	20	M	M5a	FLT-ITD, CBL DeltaExon8
<b>HL60</b>	35	W	M2	Keine Angaben
<b>Kasumi-1</b>	7	M	M2	t(8/21), RUNX1-RUNX1T1

**Tabelle 2: Verwendete AML Zelllinien**

## **MV-4**

Die Zelllinie MV4-11 stammt aus dem Blut eines 10jährigen Jungen mit AML, Subtyp FAB M5. Die Zellen werden beschrieben als *FLT3-ITD* positiv und als Träger einer Translokation der Chromosomen 4 und 11. Es wurde ein Fusionsgen *MLL-AFF1* (*MLL-AF4*) gefunden. In der Immunfluoreszenzanalyse des DSMZ besteht Positivität für CD4, CD13, CD15 und CD33.

## **OCI**

Nach Erstdiagnose einer AML Subtyp FAB M4 wurde die Zelllinie OCI-AML3 1987 aus dem peripheren Blut eines 57jährigen Mann etabliert. OCI-AML trägt neben einer NPM-1 Mutation eine *DNMT3A R882C* Mutation. Die Zelllinie ist nach DSMZ Angaben positiv für CD4, CD13, CD15 und CD45. CD33 wird im aktuellen Katalog nicht näher beschrieben.

### **1.3. AMG 330 und Negativkontrolle**

AMG 330 ist ein bispezifischer Antikörper, der mittels rekombinanter DNA Technologie hergestellt und in einer CHO Zelllinie exprimiert wurde. Er besteht aus zwei scFv (single chain variable fragment) Fragmenten, deren N-Terminus spezifisch für humanes und Javaner Affen CD33 ist, während der C-Terminus spezifisch an die  $\epsilon$ -Kette von humanem und Javaner Affen CD3 im T-Zellrezeptor bindet. Die Reinigung des Antikörpers wurde in einem zweistufigen Vorgehen mittels Nickel-Chelatchromatographie gefolgt von Gelfiltration durchgeführt.

Für den Kontrollantikörper wurde der N-Terminus gegen eine für Herbizide spezifische Einzelkette ausgetauscht.

AMG 330 und der Kontroll-BiTE® Antikörper wurden durch AMGEN Research Munich im kryokonserviertem Zustand (-80°C) für die Versuche zur Verfügung gestellt. Die Generierung und Produktion von AMG 330 ist bereits für andere BiTE® Antikörperkonstrukte beschrieben worden (Lutterbuese, Raum et al. 2010).

**1.4. Farbkonjugierte Antikörper****Antikörper FACS Calibur (LFL 2000-2012):** Beckman Coulter, Krefeld

CD33 Expressionsanalyse auf AML Zellen:

<b>Zielantigen:</b>	<b>Fluoreszenz:</b>	<b>Klon:</b>
CD33	PC5	D3HL60.251
IgG1 Isotyp		

**Antikörper FACS Navios (LFL ab 2012)** Beckman Coulter, Krefeld

CD33 Expressionsanalyse auf LIC und HSC

<b>Zielantigen:</b>	<b>Fluoreszenz:</b>	<b>Klon:</b>
CD33	PC7	D3HL60.251
CD34	ECD	581
CD38	FITC	LS198-4-3
CD45	KrO	J33
Isotypen		Analog Zielantigen

**FACS Calibur Antikörper (Helmholtz Zentrum)**

für durchflusszytometrische Zytotoxizitätsanalysen (AMG 330 Versuche):

<b>Zielantigen:</b>	<b>Fluoreszenz:</b>	<b>Klon:</b>
7AAD		
CD3	FITC	SK7 (e-bio, San Diego, CA)
CD33	PE	WM-53 (e-bio, San Diego, CA) HIM3-4-( biolegend, San Diego, CA)
Isotypen		Analog Zielantigen

**1.5. Kits**


---

<b>Diamond CD34 Isolation Kit</b>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
-----------------------------------	------------------------------------

---

**1.6. Chemikalien**

Alpha MEM Eagle Medium (mit L-Glutamine, mit RNS, mit DNS, mit 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> )	Pan Biotech, Aidenbach
BSA (Bovines Serumalbumin)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SERVA Electrophoresis GMBH, Heidelberg
DPBS (Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung)	PAN Biotech, Aidenbach
EDTA (0,5M) (Ethyldiamintetraessigsäure)	GIBCO Life Technologies, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FKS)	GIBCO Life Technologies, Eggenstein
Ficoll 1,077g/ml (Bicoll Separating Solution)	Biochrome AG, Berlin
Formaldehyd (37%)	Carl Roth, Karlsruhe
Hepes Pufferlösung (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	GIBCO Life Technologies, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin/Glutamin	Invitrogen, Darmstadt
Pferdeserum	Sigma Aldrich, München
RPMI 1640 Medium (mit L-Glutamine, w 2,0g/L mit Nahco <sub>2</sub> )	PAN Biotech, Aidenbach
β-2mercaptoethanol	Sigma Alderich, München
Trypanblau 0,4%	GIBCO Life Technologies, Eggenstein
IMDM (Iscover modifiziertes Dulbecco Medium)	PAN Biotech, Aidenbach

---

ColonyGel 1101	ReachBio, Seattle, WA
Steriles Wasser	Helmholtzzentrum
Fc-Block (FcR Blocking Reagent)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

### **Selbst hergestellte Lösungen und Puffer**

#### **FACS Fix:**

- FACS-Puffer
- 2% Formaldehyd (37%)

#### **FACS/MACS Puffer :**

- 500ml PBS
- 2,5ml BSA (0,5%)
- 2ml EDTA (0,5M)

#### **R10-Medium:**

- 500ml RPMI1640
- 50ml FKS
- 5ml Hepes-Pufferlösung
- 5ml Penicillin/Streptomycin/Glutamin

#### **Blasten-Medium:**

- Alpha MEM 500ml
- 12,5 % Pferdeserum
- 12,5% FKS
- 5ml Penicillin/Streptomycin/Glutamin

#### **Kyro-Medium zur Kyrokonservierung von viablen Zellen:**

- 80% FKS
- 20% DMSO

### 1.7. Geräte und Materialien

CO <sub>2</sub> - Inkubator	Binder, Tuttlingen
Durchflusszytometrie Rörchen Polystrene	BD Biosciences, Heidelberg
Round-Bottom Tube	
FACSCalibur/	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon Rörchen Polypropylene Conical	BD Biosciences, Heidelberg
Tube	
Frier-Container Nalgene Freezing Container	Thermo Scientific, Waltham, MA
Gefrierschränke Hera freeze	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA
Kühl und Gefrierschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kyrorörchen Cyrogenic vilas	Star Lab, Hamburg
Lamina-flow Werkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Lithium-Heparin Rörchen S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
MACS Blunt-End Needles 16-gauge (steril)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop DM IL	Leica, Solms
FACSNavios	Beckmann Coulter, Krefeld
Pasteur Pipette	VWR International, Radnor, PA
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten (10-1000 µl)	Eppendorf Research, Hamburg
Pipetten Costar (2-25ml)	Corning, Kennebunk, ME
Pipettenspitzen (10-1000 µl)	Eppendorf Research, Hamburg
Sicherheitsflügelkanüle S-Multifly-Set	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Abdecktücher Secu-Drape	Sengewald, Rohrdorf
Tischzentrifuge	Fisher Scientific, Schwerte
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY
Wasserbad ED 13	Julaba, Seelbach
Zellkulturplatten	Becton Dickinson Labware, Heidelberg

Zählplättchen	Invitrogen, Darmstadt
Zellkulturflaschen	BD Bioscience, Heidelberg
Zellkulturplatten Gridding Scoring Dishes	Stemcell Technologies, Köln
Zellzähler Countess	Invitrogen, Darmstadt
Zentrifuge Multifuge 3 s-r	Thermo scientific, Waltham, MA
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo scientific, Waltham, MA

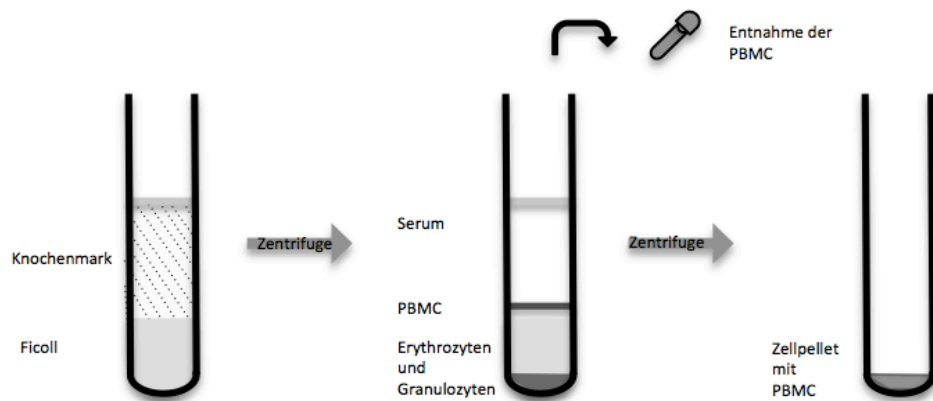
### 1.8. Computerprogramme

Cell Quest pro	BD Biosciences, Heidelberg
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, Washington
Navios tetra software	Beckmann Coulter, Krefeld
SPSS Statistics (Version 20)	IBM, Armonk, NY
SPSS Tables	IBM, Armonk, NY
GraphPad PRISM (Version 5)	Graphpad Software Inc., San Diego, CA
Flowjo (Version 9.6)	Tree Star Inc., Ashland, Oregon

## 2. Methoden

### 2.1. Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus dem Vollblut (PBMC)

PBMC bezeichnet Zellen des Blutes mit rundem Zellkern, die mit Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten von den übrigen Blutbestandteilen getrennt werden können. Nach der Zentrifugation verbleiben diese Zellen auf einer Grenzfläche von hochmolekularen Polymeren der Ficolllösung. Grund hierfür ist die niedrigere Dichte der Zellen im Vergleich zu der Dichte der Polymerenlösung. Zu den PBMC zählen Lymphozyten, Monozyten und myeloische Vorläuferzellen. Das Vollblut der gesunden Spender wurde in Lithium-Heparin Röhrchen abgenommen und mit Hilfe des beschriebenen Ficoll-Dichtegradienten die



**Abbildung 8: Trennung der PBMC mit Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten**

PBMC von übrigen Blutbestandteilen getrennt. Die gesunden Spender haben ihr schriftliches Einverständnis vor der Probenentnahme gegeben. Im ersten Schritt wurden die Proben mit kaltem PBS in einem 50ml Falcon in einem Verhältnis von mindestens 1:2 verdünnt. In einem neuen 50ml Falcon mit 12ml Ficoll wurde dann die verdünnte Lösung langsam auf die Ficollschicht laufen gelassen, sodass eine Grenzschicht deutlich sichtbar blieb.

Die anschließende Zentrifugation fand 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT), 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm) und ohne Abbremsung statt. Nach der Zentrifugation hatte sich die Fraktion der PBMC Zellen deutlich von den Erythrozyten und Granulozyten abgesetzt. Mit Hilfe einer Pasteur Pipette konnte die entstandene Schicht der PBMC zwischen Serum und Ficolllösung aspiriert werden. Nach Aufnahme in R10-Medium wurden die isolierten PBMC in zwei



Waschschritten jeweils 10 Minuten bei RT und 1800 rpm zentrifugiert, anschließend der Überstand abgegossen und das Zellpellet resuspendiert (siehe Abbildung 11).

Zur Zellzählung sind 20µl der in Medium suspendierten Zellen in einem Loch einer 96-wellplatte mit 20µl Trypanblau gefärbt worden. Die anschließende Bestimmung von Anzahl und Verhältnis lebender zu toter Zellen wurde mit Hilfe eines automatischen Zellzählgerätes durchgeführt.

## **2.2. Kyrokonservierung und Auftauen von PBMC**

Die in ein Falcon überführten Zellen wurden mit PBS in einem Verhältnis von  $1 \times 10^7$  pro 400µl aufgenommen und auf die entsprechende Anzahl von Kyroröhrchen verteilt. Anschließend wurden jeweils 400µl Kyro-Medium langsam auf die Zellen getropft. Die Kyroröhrchen wurden mit Hilfe eines Kyro-Containers (Mr. Frosty), der Kühlraten von fast genau  $-1^\circ\text{C}/\text{Minute}$  einhält, bei Minus  $-80^\circ\text{C}$  konserviert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad und schneller Verdünnung in warmen R10-Medium. Die Zellen wurden zweimal bei 550g je fünf Minuten gewaschen, bevor sie zur Analyse verwendet wurden.

## **2.3. Immunphänotypisierung**

### **2.3.1. Durchflusszytometrie und Färbung**

Bei der Durchflusszytometrie werden fluoreszenzmarkierte Zellen in hoher Geschwindigkeit durch den Messbereich eines Laserstrahls geführt. Entsprechend Größe (FSC) und Granularität (SSC) kann eine erste Einschätzung zum Zelltypen vorgenommen werden. Mit Hilfe von farbkonjugierten Antikörpern können Antigene auf der Oberfläche der Zellen markiert werden, dessen jeweiliges Streulicht dann im Fluoreszenzdetektor sichtbar wird. So können Zellen verschiedener Linien unterschieden und definiert werden.

Im ersten Schritt wurde die gewünschte Anzahl an Zellen in einem 50ml Falcon mit PBS aufgefüllt und von den Bestandteilen des Mediums 5 Minuten lang bei 1500 rpm in der Zentrifuge getrennt. Nach Abgießen des Überstandes und Resuspension des Pellet, folgte ein Waschschritt mit 1ml FACS-Puffer und erneutes Abgießen sowie Resuspension. Anschließend wurden die Zellen auf FACS-Röhrchen aufgeteilt. In jedem Röhrchen befand sich eine Zellzahl

zwischen  $5 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen. 10  $\mu$ l Fc-Block wurde jedem Röhrchen zugegeben, gefolgt von einem Inkubationsschritt für 10 Minuten im Kühlschrank. Der Fc-Block diente der Vermeidung von ungewünschter Bindung des Fc-Teils der Antikörper über CD16, CD32 oder CD64 Rezeptoren an den Zielzellen. Ein weiterer Waschschrift mit FACS-Puffer folgte, bevor die jeweilige Menge an farbkonjugierten Antikörpern nach Herstellerangaben oder Titration zugegeben wurde. Nach Durchmischen und 15 minütiger Inkubation im Kühlschrank ohne Licht folgte ein erneuter Waschschrift mit FACS-Puffer. Schließlich wurde zur Fixation der Antikörper-Antigenbindung 100  $\mu$ l FACS-Fix zur Vernetzung der Oberflächenproteine in jedes Röhrchen pipettiert.

### **2.3.2. FACS-Analyse durch das Labor für Leukämiediagnostik**

Die CD33-Expressionsanalyse von Patienten zwischen dem 10. März 2000 und 20. August 2012 wurde im Labor für Leukämiediagnostik der Universität München an einem FACSCalibur® mit 4 Farb-Analyser bei 2 Lasern pro Röhrchen gemessen. Die PBMC wurden vom LFL mittels Ficoll-Dichtezentrifugation von den anderen Zellen getrennt. Die anschließende Färbung durch farbkonjugierte Antikörper fand nach dem Schema eines vom LFL etablierten AML-Panels für diagnostische Zwecke statt.

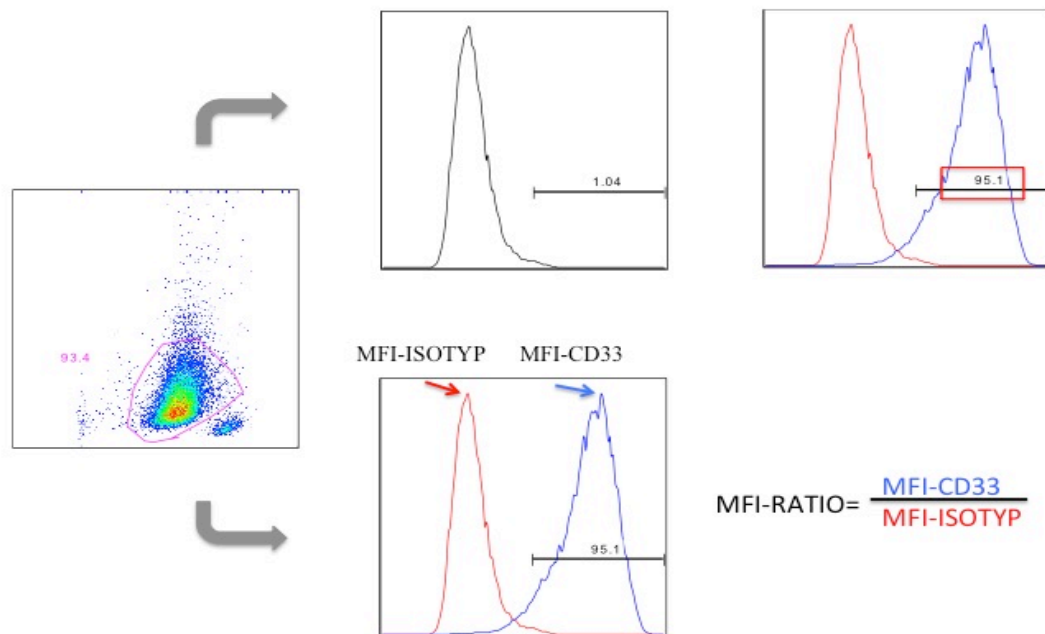
Proben von Patienten, bei denen die CD34+/CD38- Zellen untersucht und verglichen wurden, sowie Knochenmarksproben von gesunden Spendern sind an einem Navios® FACS-Gerät gemessen worden. Das Navios® verfügt über maximal 10 Farb-Analyser bei drei Lasern pro Röhrchen. In jedem Probenröhrchen befand sich dabei ein CD45 Antikörper, mit dessen Hilfe die Population der AML Blasten im Gate besser von den anderen Zellen getrennt werden konnte. Die Färbung des CD45 Antigens eignet sich hervorragend zur Unterscheidung von differenzierten Zellen der myeloischen und lymphatischen Reihe sowie unreifen Leukämiezellen (Lacombe, Durrieu et al. 1997).

### **2.3.3. Gatingstrategie und Evaluierung der Oberflächenexpression (MFI-Ratio)**

Die durchflusszytometrischen Primärdaten der Knochenmark- und Blutproben aus dem LFL wurden mit Hilfe der Software FlowJo auf CD33-Expressionsintensität ausgewertet (MFI-Ratio(Mean Fluorescence Intensity = MFI)).

Im „Forward Scatter/Side Scatter“ (FFC/SSC) wurde die Population von AML-

Zellen durch Festlegung eines sogenannten Blastengates nach Größe und Granularität ausgewählt. Eine Isotypenkontrolle mit einem unspezifischen Antikörper, der mit dem gleichen Fluorchrom wie der CD33 Antikörper konjugiert wurde, diente als Hintergrundkontrolle. In einem anderen Röhrchen befand sich der CD33 Antikörper zur spezifischen Färbung der AML Zellen.



**Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der Definition positiver Blasten in einer Probe und der Berechnung einer MFI-Ratio mit Hilfe der Isotypkontrolle**

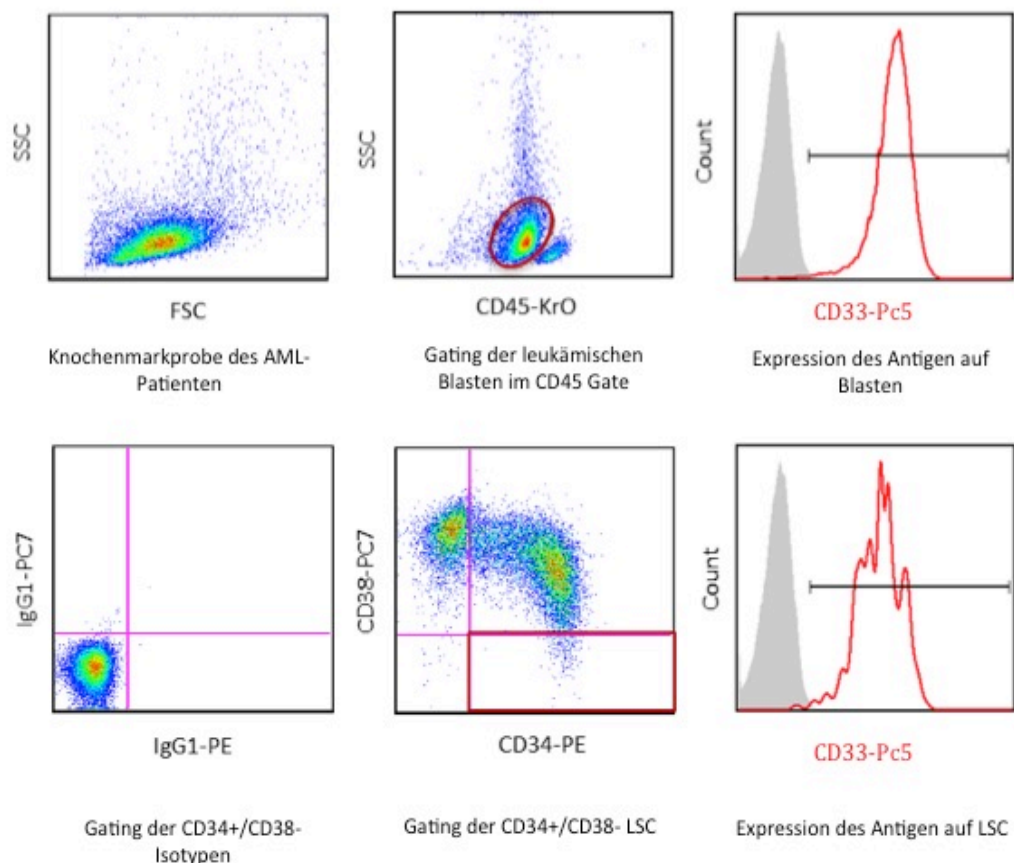
Es gibt im Wesentlichen zwei Möglichkeiten, die Antigenexpression auf der Oberfläche von AML Zellen zu bestimmen:

Die Fluoreszenz, bei der 99% der Zellen mit Isotyp-Kontroll-Antikörper erscheinen, ergibt die Negativkontrolle (Beispiel im 1. oberen Histogramm). Somit werden alle mit CD33-Antikörper gefärbten Zellen, die eine höhere Fluoreszenz aufweisen, als positiv gewertet. Sind mehr als 20% der gefärbten Zellen positiv für CD33, definiert sich danach eine CD33 positive AML (Bene, Castoldi et al. 1995) (Beispiel im 2. oberen Histogramm).

Bei der Ermittlung der MFI-Ratio wird der Mittelwert aller fluoreszierenden Zellen im Gate berechnet. Die Division der CD33 MFI durch den MFI des Isotyp-Kontroll-Antikörpers ergibt die MFI-Ratio und erlaubt eine Aussage über die Expressionsstärke auf den Zellen und damit ein Vergleich zwischen den Proben

(unteres Histogramm). Während erstere Methode lediglich eine Aussage über Positivität der AML-Probe trifft, ist nach der Berechnung der MFI-Ratio auch ein Vergleich über die Höhe der Expression unter den verschiedenen Proben möglich. Ca. 90% der AML Proben werden als positiv für CD33 beschrieben (Bene, Castoldi et al. 1995). Bei der heterogenen Verteilung der CD33 Expression bietet sich daher die Auswertemethode mittels MFI-Ratio an.

#### 2.3.4. Bestimmung von CD34+/CD38- Zellen



**Abbildung 10: Gating der CD34+/CD38- Zellen.** In der oberen Zeile wird die MFI-Ratio auf allen AML Zellen bestimmt, in der unteren Zeile im Kompartiment der CD34+/CD38- Zellen.

Die Auswahl der AML Zellen wurde im SSC/CD45 Dotplot nach Granularität und Färbeintensität von CD45 getroffen. Anschließend wurden nach oben beschriebener Methode die MFI-Ratio der Zellen im Blastengate berechnet. Um die Zellen im Kompartiment der CD34+/CD38- Zellen zu bestimmen wurde anhand der jeweiligen Isotypkontrollen für CD34 und CD38 ein Gate gesetzt (siehe Abbildung 13). Bei den CD34+/CD38- Zellen ist nach dem oben beschriebenen Verfahren die MFI-Ratio von CD33 ermittelt worden um sie mit den übrigen Zellen im Blastengate vergleichen zu können.

#### **2.4. Evaluierung von Prognosefaktoren aus der zentralen Datenbank im Labor für Leukämiediagnostik**

Im Rahmen der Standarddiagnostik wurden für die Patientenproben mit der Erstdiagnose einer AML Ergebnisse aus Immunphänotypisierung, Zytomorphologie, Zytogenetik, Fluoreszenz-in-situ Hybridisation und Molekulargenetik in einer zentralen Datenbank dokumentiert. Mit den vorhandenen Daten wurden die Patienten, falls möglich, nach der ELN und MRC Klassifikation in Subgruppen unterteilt. Um den Bezug von CD33 Oberflächenexpression und jeweiligen AML Subtyp zu vergleichen, standen nun neu ausgewertete Expressionsdaten und dokumentierten Daten aus der Datenbank zur Verfügung.

#### **2.5. Zellkultur**

Alle AML-Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin/Glutamin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden in der Regel alle drei Tage abhängig von Farbe und Trübung des Mediums im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet. Alle Zelllinien wurden vor Ansatz eines Experimentes mindestens 7 Tage nach dem Auftauen im Inkubator kultiviert.

#### **2.6. Separation von CD34+/Lin-Zellen für die CFU Assays**

Eine Separation diente der Trennung von CD34 positiven und Linienmarker negativen hämatopoetischen Stammzellen von den übrigen Zellen zur Verwendung dieser Zellen in CFU Assays. Mit Hilfe eines Diamond CD34 Isolation Kit von Miltenyi Biotec wurde, in einer gemeinsamen Versuchsdurchführung mit Christina Krupka, nach Markierung mit magnetischen Partikeln versehenen Antikörpern eine Separation an einer magnetischen Säule durchgeführt, um die Linienmarker positiven Zellen zu entfernen.

Die zuvor isolierten PBMC wurden in 200µl FACS Puffer aufgenommen und gelagert. Danach wurde 50µl „Diamond Lin Biotin-Antibody Cocktail“ zu den Proben gegeben und sie wurden 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Ein Waschgang mit 5ml FACS Puffer und anschließender 10 minütiger Zentrifugation mit 1800 rpm bei 4 °C folgte. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Zellzahl in ca. 400µl MACS Puffer resuspendiert. Die „Anti Biotin MicroBeads“ wurden einem Volumen von 100µl zugegeben und 15 Minuten lang

im Kühlschrank inkubiert.

Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Pellet in 1ml MACS Puffer resuspendiert. Der Säule wurde zur Filterung noch ein Pre-Seperation Filter ausgesetzt, um Zelldetritus mit unspezifischer Bindung aus dem Eluat zu entfernen. Danach wurde die Säule mit 2 ml MACS Puffer gespült und das sich lösende Eluat aufgefangen. In der Säule wurden die mit den Bead Antikörper gebunden Zellen an den Magneten fixiert, sodass ein Eluat ohne CD 33 Linienmarker positiver Zellen gewonnen werden konnte. Nach einem Waschschrift folgte die Resuspension in 200µl MACS Puffer gemeinsam mit 50µl „CD34 Diamond MicroBeads“, um eine reine Population an Zellen für den Assay zu erhalten. Im Kühlschrank wurde 30 Minuten inkubiert und ein erneuter Waschschrift mit 5ml MACS Puffer folgte bevor die vorbereitete MS Säule mit 500µl MACS Puffer gespült wurde. Danach ist die Säule aus dem Magnetfeld gezogen worden und über einem 15ml Falcon Röhrchen mit 1,5 ml MACS Puffer ausgespült worden. Zuletzt wurde der Stempel aufgesetzt, um den Rest mit Hilfe des Puffers und Druck durch die Säule zu pressen. Alle genannten Puffer und Reagenzien waren im Kit enthalten.

## **2.7. Kolonieformierende Einheiten**

Die CD34+ und Linienmarker negativen Zellen wurden im ersten Schritt in 1,5ml IMDM Medium mit 2% FCS aufgenommen und am Zellzähler gezählt. Die Zellen wurden auf  $3 \times 10^4$  Zellen pro ml eingestellt und 5ng/ml oder 5µg/ml AMG 330 zugegeben. 300µl von der Suspension wurden dann in 5ml Kulturröhrchen mit je 3ml Koloniegel überführt und gemischt. Die Kulturröhrchen wurden für 5 Minuten stehen gelassen, um die entstandenen Luftblasen zu entfernen. Dann wurde jeweils 1,1ml der Zellsuspension mit einer Spritze mit stumpfer Nadel auf zwei 35mm Kulturplatten gegossen. Gemeinsam mit einer 35 mm Kulturplatte mit sterilem Wasser wurden die beiden Kulturplatten in einer 100 mm Kulturplatte bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator für 15 Tage inkubiert. Am Ende der Kultur dauern wurde mit dem Mikroskop die Anzahl und Morphologie der Kolonien bestimmt. Die Plattierung wurde gemeinsam mit Christina Krupka im Helmholtz-Zentrum München durchgeführt.

## **2.8. Titration des E:T Ratios für AMG 330 Zytotoxizitätsversuche**

Die E:T abhängige Eliminierung von AML Zellen durch AMG 330 wurde mit der

Zelllinie OCI und PBMCs von einem gesunden Spender in den Verhältnissen 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 und 1:20 durchgeführt. Die PBMCs und AML Zellen wurden in eine 12well Platte eingesetzt; AMG 330 und der Kontroll-Antikörper wurden mit 5ng/ml dazu gegeben. Dabei war die Anzahl der AML Zellen konstant, während diejenige der PBMCs nach gewünschter E:T Konzentration ausgewählt wurde.

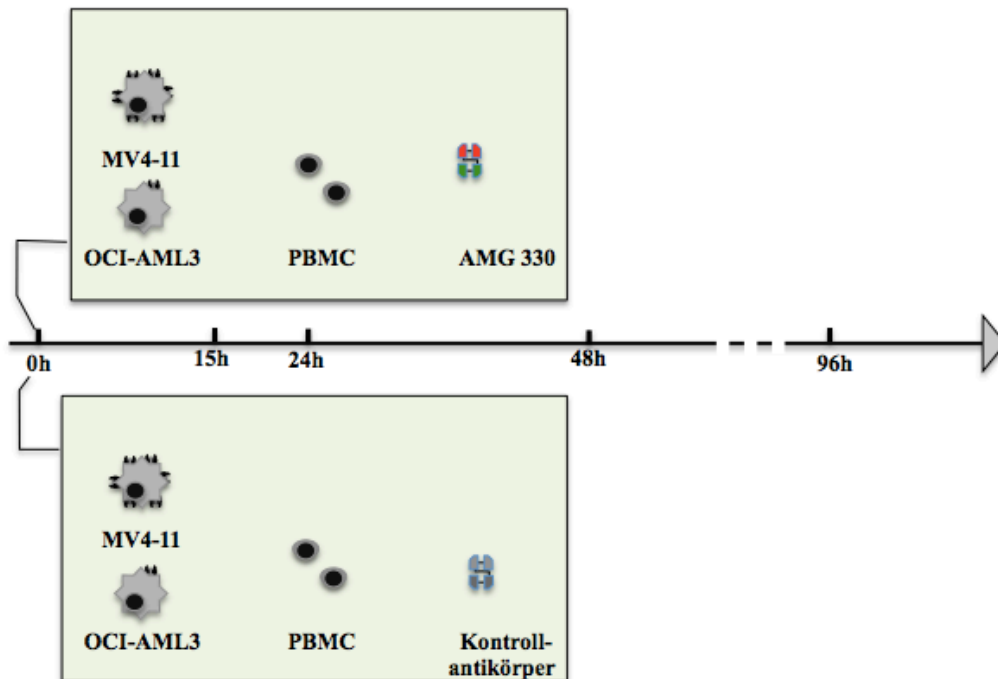
Die Kulturen wurden aufgrund der starken Proliferation der AML Zellen alle vier Tage gesplittet. Die Anzahl lebender Zellen wurden mittels Zellzählung und FACS Messung ermittelt. Dazu wurden neben der Selektion im FSC/SSC auch mittels CD3 (mit CD3 APC Antikörpern) und CD33 Färbung (mit CD33 PE Antikörpern) zwischen den verschiedenen Zellentitäten differenziert. Es wurde jeweils nach 0, 4, 8, 12 und 16 Tagen gemessen. Anhand des prozentualen Anteils CD33 positiver Zellpopulation in der Gesamtzellzahl konnte dann auf die verbleibende AML Zellzahl zurückgerechnet werden. Das Verhältnis aus AML Zellzahl am Tag 0 sowie des jeweiligen Messtages ergab eine quantitative Reduktion („Fold change“) von CD33+ Zellen, suggerierend für eine AMG 330 vermittelte Eliminierung der AML Zellen. Berechnet wurde die Reduktion anhand folgender Formel:

$$\text{Fold change: } \frac{\text{Anzahl der viablen Zellen} \times \text{CD33+Zellen (\%)} \text{ am Messtag}}{\text{Anzahl der viablen Zellen} \times \text{CD 33 Zellen (\%)} \text{ am Tag 0}}$$

## 2.9. Expressionsabhängige Zelllyse von AML Zellen durch AMG 330

Die Zelllinie MV-4, mit hoher CD33 Expression und OCI-AML3 mit niedriger CD33 Expression (siehe Kapitel 3.2.4.) wurden gemixt und mit PBMCs von gesunden Spendern sowie AMG 330 oder Kontrollantikörper 15-96 Stunden lang kokultiviert. An verschiedenen Messzeitpunkten wurden, in einem gemeinsam mit Christina Krupka durchgeführten Experiment, die Kulturen geerntet, die Zellzahl bestimmt, anhand der CD33 Expression zwischen beiden Zelllinien unterschieden und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abbildung 16). Die kryokonservierten PBMC wurden nach dem Auftauen gezählt und in R10-Medium aufgenommen. Bei fester AML Zellzahl wurden die PBMCs in den Ratios 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 wurden mit beiden Zelllinien vermischt. In der Kontrollzählung befanden sich insgesamt zwischen  $1,1 \times 10^6$  Zellen/ml (E:T 1:1) und  $6,3 \times 10^5$  Zellen/ml (E:T 1:4) Medium auf der verwendeten 12well-Platte. Den Kulturen wurde jeweils 5ng/ml AMG 330 oder Kontrollantikörper zu Beginn

des Experiments zugegeben. Die Mixkultur wurde im Brutschrank bei 37 Grad und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und an den Zeitpunkten 0., 15., 24., 48., 72. und 96. Stunden im automatischen Zellzähler gemessen.



#### Abbildung11: Schema der 96 Stunden Kokultur

Die Färbung für die durchflusszytometrische Analyse fand nach standardisiertem Schema mit CD14 FITC, CD33 PE, CD3 APC und den jeweiligen Isotypkontrollen statt. Zur Evaluierung der verbleibenden AML Zellen wurden CD3 negative und CD14 negative Zellen „heraus gegatet“ um die MV4 und OCI Zellen ohne Lymphozyten und CD33 positive Monozyten des gesunden Spenders betrachten zu können. Die Prozentzahl der jeweiligen Zellpopulation wurde mittels FACS ermittelt und zur gemessenen Zellzahl mit folgender Formel berechnet:

$$X = \text{Gesamtanzahl aller vitaler Zellen} \times \frac{\text{Anteil der Population im FACS in \%}}{100}.$$

Anhand der unterschiedlich hohen CD33 Expression wurden die beiden Zelllinien unterschieden.

#### 2.10. Statistische Analyse

Nachdem alle Patienten anhand der CD33 Expression in drei gleichgroße Terzile

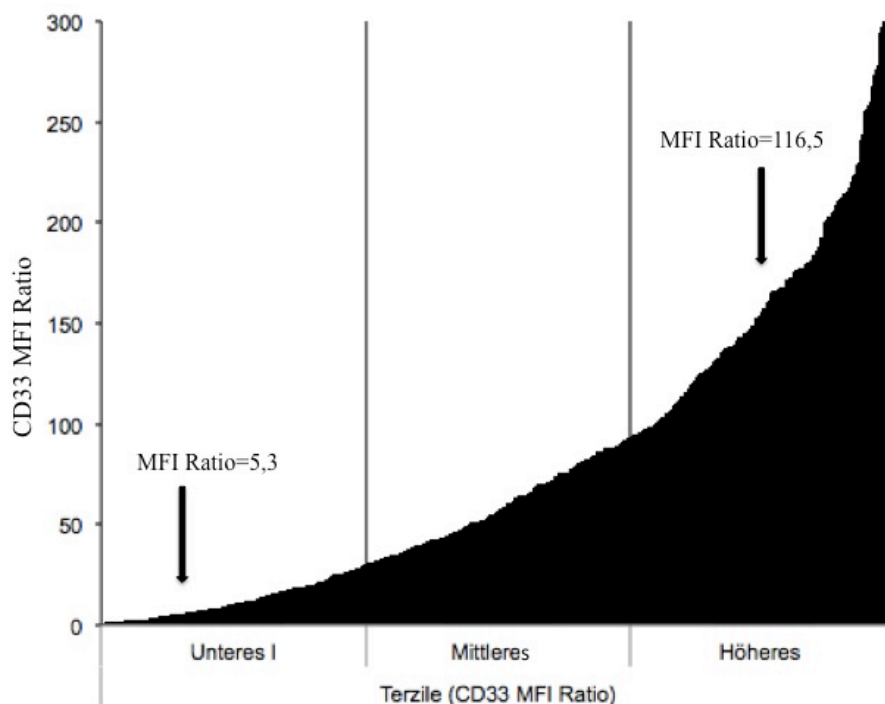


eingeteilt wurden, ist die Signifikanz zwischen den Terzilen mit dem Pearson's  $\chi^2$  Test durchgeführt worden. Mit Ausnahme von Differenzen im Alter der Patienten, wessen Ränge mit dem Kruskal-Wallis Test getestet wurden. Die Differenzen zwischen den kolonieformierenden Einheiten sowie Unterschiede der Subgruppen in der LIC Auswertung und kolonieformierenden Einheiten wurden mit dem Man-Whitney U Test durchgeführt. Um interpersonelle Unterschiede bei der Festlegung einer Gate im Rahmen der CD34+/CD38- Auswertung zu untersuchen, wurde der Spearman Rho Korrelationskoeffizient ermittelt. Der Vergleich von LIC bzw. HSC und den restlichen Zellen wurde mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rank Test durchgeführt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit SPSS Version 20 durchgeführt.

## IV. ERGEBNISSE:

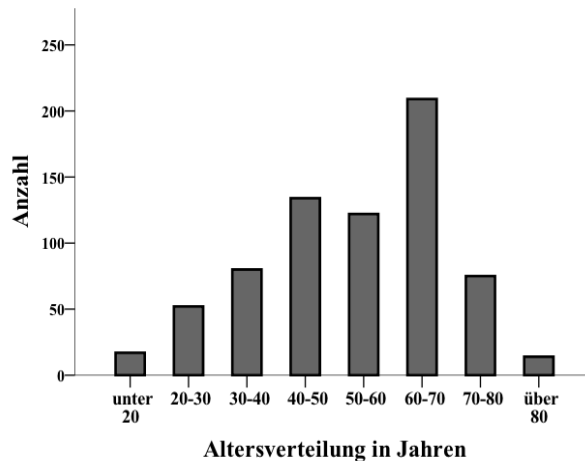
### 1. CD33 Expressionsintensität bei AML Erstdiagnosen

Die Intensität der CD33 Expression wurde bei 621 AML Erstdiagnosen evaluiert. In über 99% der Fälle konnte Positivität für CD33 demonstriert werden, definiert als eine MFI-Ratio über 1,5. Von 621 Patienten waren 616 positiv für CD33, bei einem heterogenen Expressionsprofil zwischen den Patienten. Der Median lag bei 57,1 mit einer Spannweite (Range) von 1,2 bis 455,5. Die CD33 Expressionsintensität wurde im nächsten Schritt mit charakteristischen Krankheitsmerkmalen korreliert, um Patientenkohorten zu identifizieren, die für eine CD33 gezielte Therapie am geeignetsten erscheinen. Dazu wurde die Kohorte in drei gleichgroße Terzile aufgeteilt. Der Median des unteren Terzils (niedrige Expression) lag bei 10,63 (Range 1,19-30,0), des mittleren Terzils bei 57,14 (Range 30,18-93,83) und der des Terzils mit hoher CD33 Expression bei 156,6 (Range 94,29-455,52). (siehe Abbildung 17)



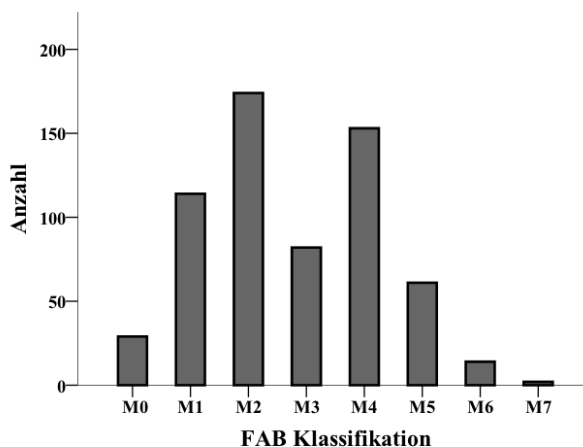
**Abbildung 12: Patientenkohorte: Die 621 Patienten wurde nach der Höhe der CD33 Expression in 3 gleich große Terzile gruppiert. Der linke Pfeil steht exemplarisch für einen Patienten mit niedriger Expression im unteren Terzil. Der rechte Pfeil für einen Patienten mit hoher Expression im oberen Terzil (Krupka, Kufer et al. 2014).**

Die Durchflusszytometrie-Daten und Patientencharakteristika von 703 Patienten mit AML Erstdiagnose wurden zwischen dem 10. März 2000 und 20. August 2012 gesammelt. Die Daten von 82 Patienten mit APL wurden in der Auswertung separat betrachtet. 660 Proben stammten aus dem Knochenmark und 43 aus dem peripheren Blut. Die Patienten waren zwischen 17 und 99 Jahre alt. Das mediane Alter lag bei 56 Jahren. Die Altersverteilung zeigte einen für AML typischen Verlauf.



**Abbildung 13: Altersverteilung von 703 AML Patienten**

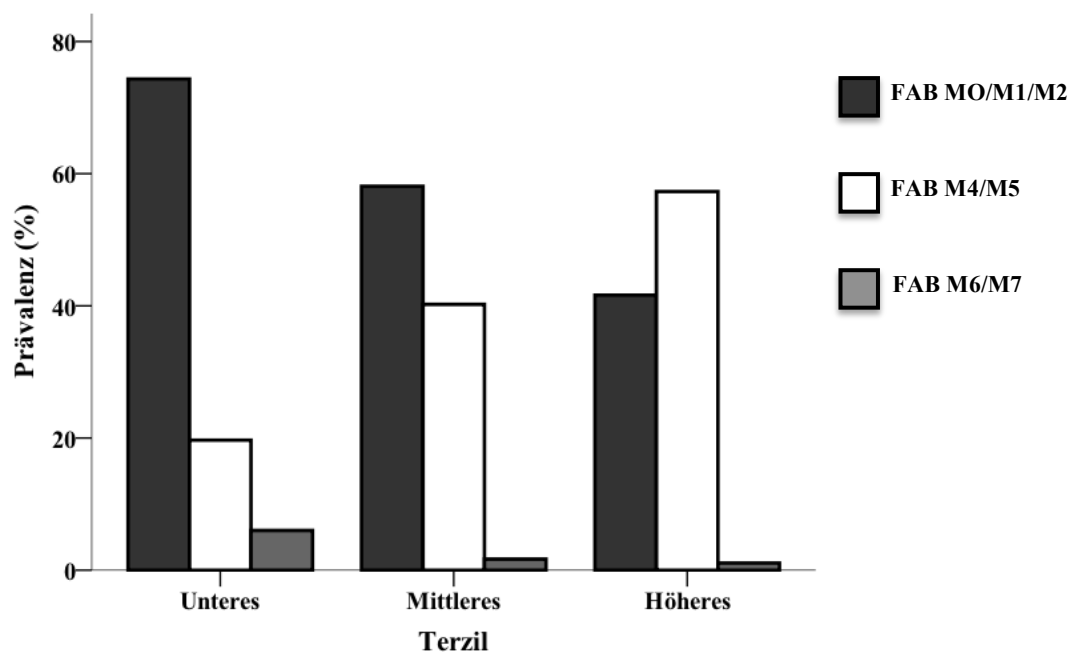
332 Patienten waren weiblich, 369 männlich. In der Zytomorphologie fanden sich im Mittelwert 68,68%, in der Durchflusszytometrie Auswertung 68,7% AML Blasten bei den Patienten. Zu 629 der 703 Patienten lagen Informationen zur FAB Klassifikation aus der Zytomorphologie vor.



**Abbildung 14: Einteilung von 629 Patienten nach der FAB Klassifikation**

### 1.1. Korrelation der CD33 Expression zum FAB Subtyp

Dokumentierte Daten zur Einteilung in die FAB Klassifikation aus der Diagnostik lagen in 547 Fällen vor. Hohe Expression korrelierte mit FAB M4/M5 (M4:  $p < 0,001$  und M5:  $p = 0,001$ ). Im Gegensatz dazu waren Patienten mit FAB Typen M0, M2 und M6/M7 mit einer niedrigen CD33 Expression assoziiert (M0:  $p = 0,02$ ; M2:  $p < 0,001$  und M6/M7:  $p = 0,009$ ). Zusammenfassend waren die Patienten mit den FAB Typen der monozytären und myelomonozytären Differenzierung (=FAB M4/M5) signifikant häufiger mit hoher CD33 Expression assoziiert als die Typen mit minimaler oder myeloischer Differenzierung ( $p < 0,001$ ).

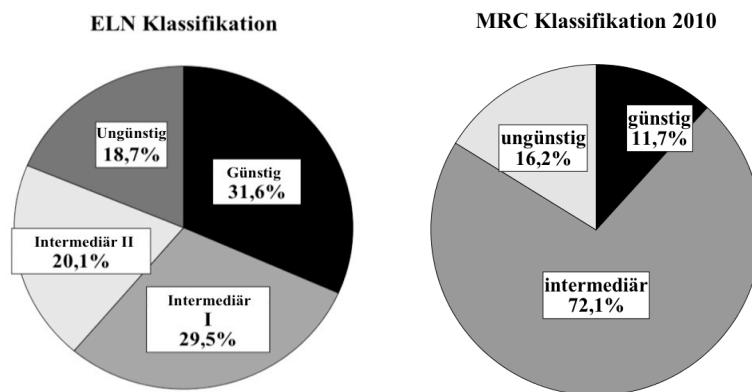


**Abbildung 15: Die Subtypen FAB M4/M5 haben die höchste Prävalenz in der Gruppe mit hoher Expressionsintensität. Die Subgruppen FAB M0/M1/M2 (schwarze Balken) und M6/M7 sind dagegen mit einer niedrigen Expression assoziiert.**

### 1.2. ELN und MRC Klassifikation

In der ELN Klassifikation wurden die molekularen und zytogenetischen Veränderungen anhand der Bedeutung ihrer Prognose betrachtet. 572 Patienten der Kohorte (ohne APL) konnten nach ELN klassifiziert werden. Es fanden sich 181 Patienten mit günstiger Prognose, 169 mit intermediärer I /115, mit Intermediärer II, sowie 107 mit ungünstiger Prognose. Die Patienten in der

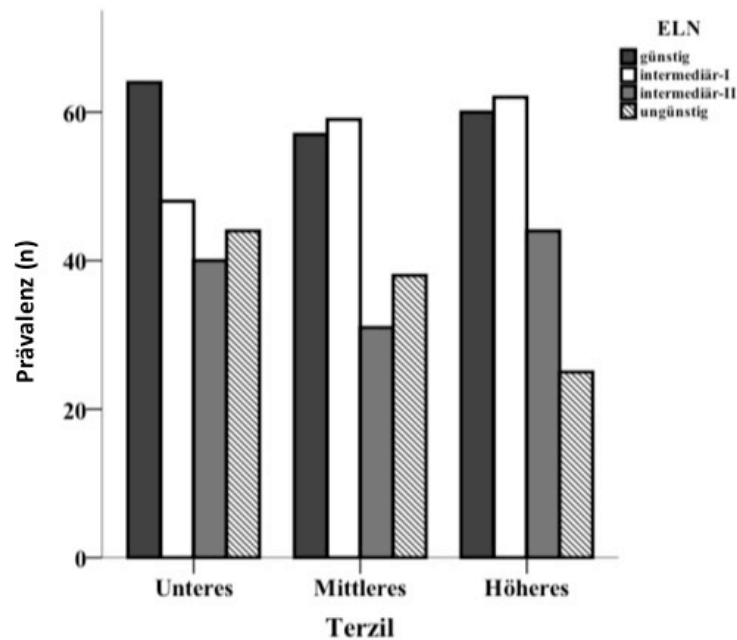
ungünstigen Gruppe hatten die signifikant größte Prävalenz in dem Terzil mit niedriger Expression T1 ( $p=0,04$ ). Für die anderen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (günstige Gruppe:  $p=0,75$ ; intermediäre Gruppe I:  $p=0,26$ ; Intermediäre Gruppe II= $0,24$ ). Dabei sollte allerdings die sehr heterogene Zusammensetzung dieser Gruppen beachtet werden. So finden sich in der günstigen Gruppe Patienten mit hoher Expression wie einer *inv(16)* oder *NPM1* Mutation neben Patienten für die niedrigere Expressionslevel gezeigt wurden, wie z.B. mit einer *t(8/21)* (im folgenden Abschnitt genauer erläutert).



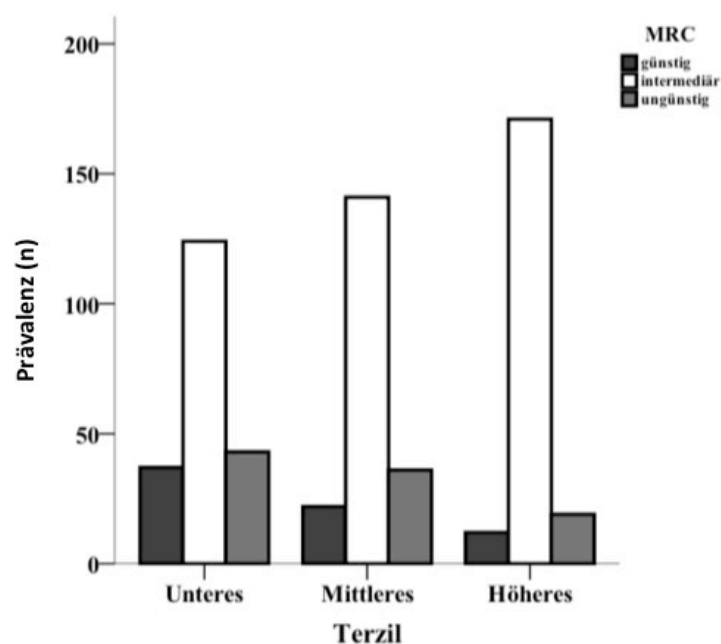
**Abbildung 16: 572 Patientenproben wurden anhand der ELN Klassifikation eingeteilt. 605 Patienten wurden nach der MRC Klassifikation eingeteilt.**

Im Bezug auf die MRC Klassifikation standen bei 605 Patienten Informationen zur Zytogenetik bei Diagnosestellung zur Verfügung. Es waren 71 als günstig, 436 als intermediär und 98 als ungünstig klassifiziert. Der Unterschied zwischen den Gruppen war nach Einteilung der MRC Klassifikation hoch signifikant ( $p<0,001$ ).

Die als günstig und ungünstig klassifizierten Patienten wurden häufiger in T1 (günstige Gruppe:  $p=0,001$ ; ungünstige Gruppe:  $p=0,004$ ) zugeteilt. Die große Gruppe mit intermediärer Zytogenetik befand sich dagegen häufiger im mittleren (T2) und besonders im höheren Terzil (T3) ( $p<0,001$ ).



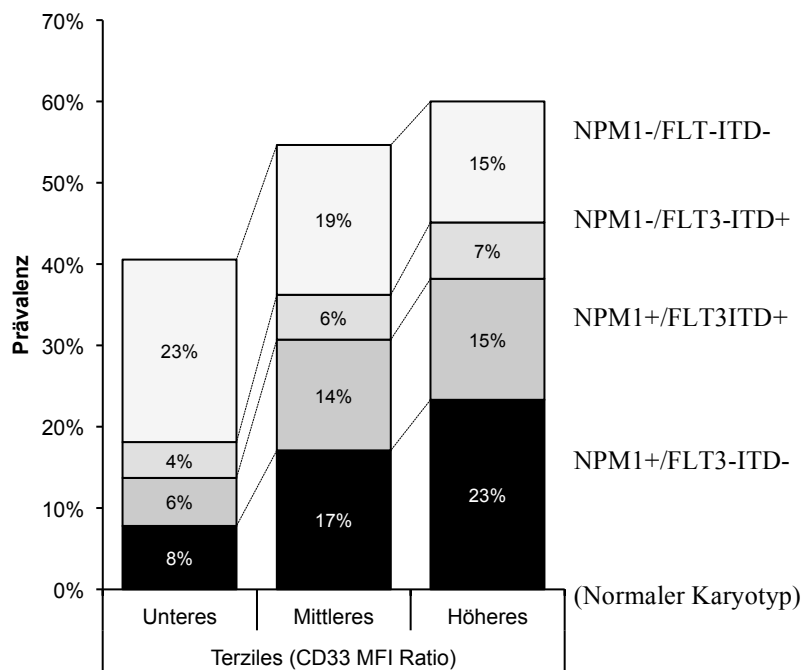
**Abbildung 17:** Die Gruppe mit ungünstiger Prognose war häufiger mit dem unterem Terzil T1 assoziiert ( $p=0,04$ ). Für die anderen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden ( $p= 0,14$ ).



**Abbildung 18:** Patienten mit günstiger und ungünstiger Zytogenetik waren häufiger dem unteren Terzil zugeordnet (günstige Gruppe:  $p=0,001$ ; ungünstige Gruppe:  $p=0,004$ ). Die Patienten mit intermediärer (I+II) Zytogenetik fanden sich am häufigsten in T3 ( $p<0,001$ ).

### 1.3. Molekulare Prognosefaktoren

Zu 511 Patienten existierten Daten zu molekularen Prognosefaktoren. 312 Patienten hatten einen normalen Karyotyp, bei 97 bestand eine Mutation des *NPM1* Gens, bei 34 Patienten wurde eine *FLT3-ITD* Mutation nachgewiesen und bei 69 Patienten waren beide Mutationen nachweisbar. *NPM1* Mutationen waren sowohl alleine ( $p < 0,001$ ), wie auch durch das Vorhandensein einer *FLT3-ITD* ( $p = 0,009$ ) signifikant mit einer hohen CD33 Expression assoziiert. Für Patienten mit alleiniger *FLT3-ITD* Mutation zeigte sich kein Unterschied in der Verteilung ( $p = 0,55$ ). Die Patienten ohne Mutationen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Expressionsintensität ( $p = 0,13$ ).

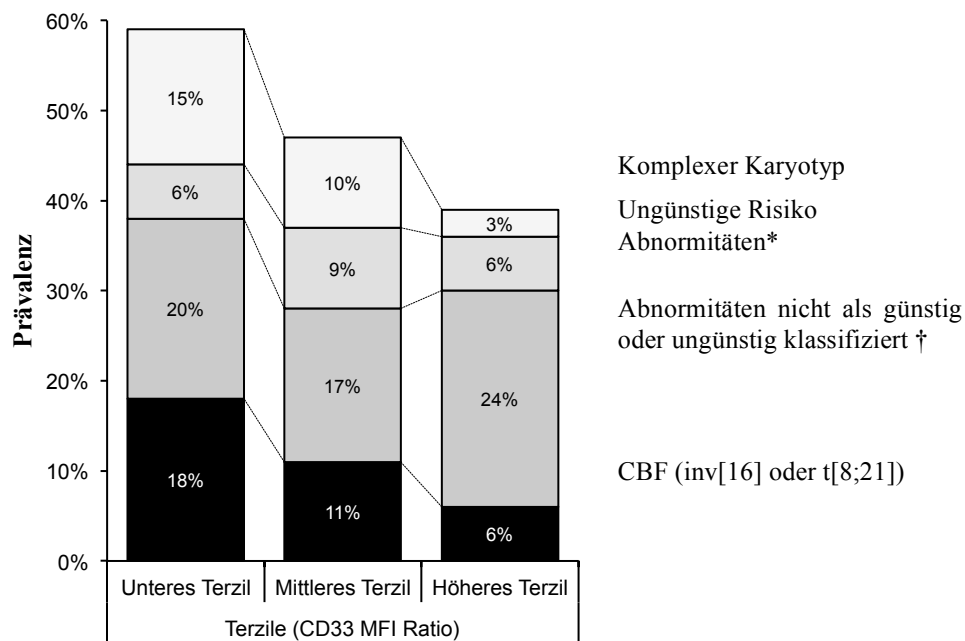


**Abbildung 19: NPM1 Mutationen bei normalen Karyotyp waren signifikant mit einer hohen CD33 Expressionsintensität assoziiert, speziell in der Gruppe der günstig klassifizierten NPM1+/FLT-ITD- Patienten ( $p < 0,001$ )/ (NPM1+/FLT-ITD+  $p = 0,009$ ). Für NPM1-/FLT3-ITD+ zeigte sich kein Trend ( $p = 0,55$ ) (Krupka, Kufer et al. 2014).**

### 1.4. Zytogenetische Prognosefaktoren

Bei 605 Patienten waren Daten über die Zytogenetik verfügbar. Mit 51,6 % (312 Patienten) hatten knapp mehr als die Hälfte der 605 dokumentierten Patienten einen normalen Karyotyp. 48,4% (293) wiesen verschiedene zytogenetische Aberrationen auf. Patienten mit t(15;17) Translokationen (APL) wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die CBF Leukämien t(8;21) und inv(16), die beide zu

den günstigen zytogenetischen Aberrationen zählen (Einteilung nach ELN und MRC, siehe Unterpunkt 1.2), verteilten sich unterschiedlich über die Kohorte: Die 31 Patienten mit t(8/21) Mutationen waren besonders häufig mit einer niedrigen Expression im unteren Terzil assoziiert ( $p < 0,001$ ), während bei den Patienten mit inv(16) ( $n=40$ ) keine Tendenz erkennbar wurde ( $p=0,24$ ).



**Abbildung 20: Patienten mit einem komplexen Karyotyp und CBF Leukämien zeigten eine höhere Prävalenz in der Gruppe mit niedriger Expression (T3). Im Gegensatz dazu konnte für die Gruppen der ungünstigen Abnormitäten und Abnormitäten die weder als günstig oder ungünstig zählen keine Unterschiede in der Verteilung beobachtet werden (Krupka, Kufer et al. 2014).** \*Eingeschlossen abn(3q), inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26), add(5q), -5/5q-, -7, add(7q)/del(7q), t(v;11)(v;q23), t(9;22)(q34;q11), -17/abn(17p), aber ausgeschlossen t(3;5)(q21-25;q31-35), t(9;11)(p21-22;q23) and t(11;19)(q23;p13) †Eingeschlossen t(9;11)(p21-22;q23), t(11;19)(q23;p13) und alle anderen nicht weiter beschriebenen Abnormitäten

Die Mutationen t(9;11)(p21-22;q23) oder t(11;19)(q23;p13) waren mit einer hohen Expressionsintensität assoziiert ( $p=0,01$ ). Für die heterogene Gruppe von Abnormitäten, die nicht als günstig oder ungünstig klassifiziert werden, zeigte sich dagegen kein Trend ( $p=0,24$ ).

Patienten mit komplexem Karyotyp waren mit einer besonders niedrigen CD33 Expression assoziiert (T1) ( $p < 0,001$ ). Die Gruppe der Patienten mit definierten ungünstigen Risikoabnormitäten (siehe auch Einleitung: Kapitel 1.2) verteilte sich dagegen über alle Terzile annähernd gleich (siehe auch Übersichtstabelle).

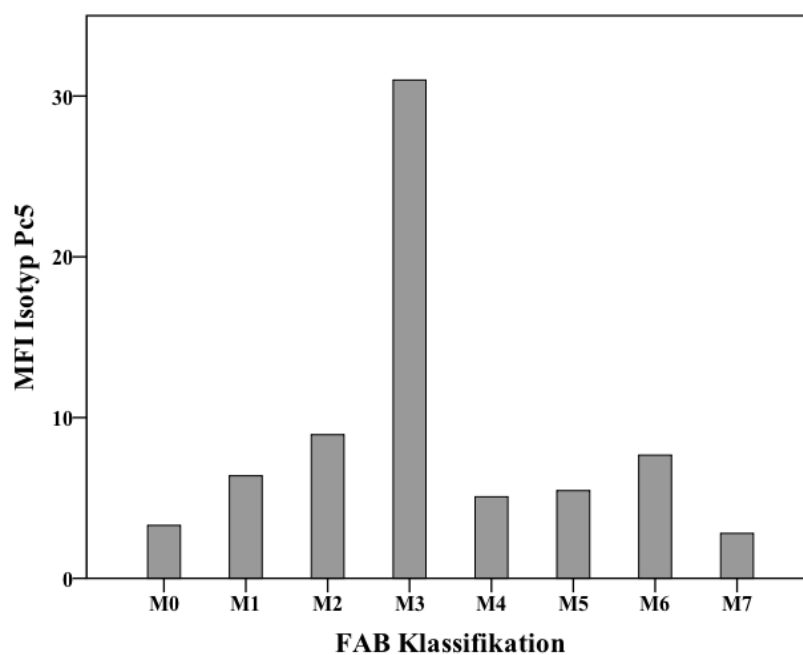


Kategorie	Alle Fälle n = 621	CD33 MFI-Ratio			P
		Unteres Terzil	Mittleres Terzil	Höheres Terzil	
CD 33 MFI-Ratio					
Median (Spannweite)	57 (1-456)	11 (1-30)	57 (30-94)	157 (94-456)	
Geschlecht, n					0.13
Männlich	337 (54%)	124 (60%)	108 (52%)	105 (51%)	
Weiblich	284 (46%)	83 (40%)	99 (48%)	102 (49%)	
Alter in Jahren					0.01
Median (Spannweite)	57 (17-99)	57 (19-99)	59 (17-82)	53 (18-89)	
FAB, n (%)					<0.001
M0	29 (5%)	15 (8%)	11 (6%)	3 (2%)	
M1	114 (21%)	41 (22%)	40 (22%)	33 (18%)	
M2	174 (32%)	80 (44%)	53 (30%)	41 (22%)	
M4	153 (28%)	26 (14%)	53 (30%)	74 (40%)	
M5	61 (11%)	10 (6%)	19 (11%)	32 (17%)	
M6 / M7	16 (3%)	11 (6%)	3 (2%)	2 (1%)	
Unbekannt	74	24	28	22	
Zytogenetik, n (%)					
t(8;21)	31 (5%)	26 (13%)	4 (2%)	1 (<1%)	<0.001
inv(16)/t(16;16)(p13;q22)	40 (7%)	11 (5%)	18 (9%)	11 (5%)	0.24
Normaler Karyotyp	312 (52%)	83 (41%)	108 (54%)	121 (60%)	<0.001
t(9;11)(p21-22;q23) / t(11;19)(q23;p13)	22 (4%)	2 (1%)	7 (4%)	13 (6%)	0.01
Abnormalitäten nicht als günstig oder ungünstig klassifiziert	102 (17%)	39 (19%)	26 (13%)	37 (18%)	0.21
Komplexer Karyotyp	55 (9%)	30 (15%)	19 (10%)	6 (3%)	<0.001
Andere ungünstige Risiko Abnormitäten*	43 (7%)	13 (6%)	17 (9%)	13 (6%)	0.63
Unbekannt	16	3	8	5	
Zytogenetische Risikogruppen, n (%)					<0.001
Günstig	71 (12%)	37 (18%)	22 (11%)	12 (6%)	
Intermediär	436 (72%)	124 (61%)	141 (71%)	171 (85%)	
Ungünstig	98 (16%)	43 (21%)	36 (18%)	19 (9%)	
Mutationen, n (%)					
NPM1+/FLT3-ITD- (normaler Karyotyp)	97 (16%)	16 (8%)	34 (17%)	47 (23%)	<0.001
NPM1+/FLT3-ITD+(normaler Karyotyp)	69 (11%)	12 (6%)	27 (14%)	30 (15%)	0.009
NPM1-/FLT3-ITD+ (normaler Karyotyp)	34 (6%)	9 (4%)	11 (6%)	14 (7%)	0.55
NPM1-/FLT3-ITD- (normaler Karyotyp)	112 (19%)	46 (23%)	36 (18%)	30 (15%)	0.13
ELN, n (%)					0.14
Günstig	181 (32%)	64 (33%)	57 (31%)	60 (31%)	
Intermediär-I	169 (30%)	48 (24%)	59 (32%)	62 (32%)	
Intermediär-II	115 (20%)	40 (20%)	31 (17%)	44 (23%)	
Ungünstig	107 (19%)	44 (22%)	38 (21%)	25 (13%)	
Unbekannt	49	11	22	16	
*eingeschlossen abn(3q), inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26), add(5q), -5/5q-, -7, add(7q)/del(7q), t(v;11)(v;q23), t(9;22)(q34;q11), -17/abn(17p), aber ausgeschlossen t(3;5)(q21~25;q31~35), t(9;11)(p21-22;q23) und t(11;19)(q23;p13)					

Tabelle 3: Übersicht über die Patientenkohorte (Krupka, Kufer et al. 2014)

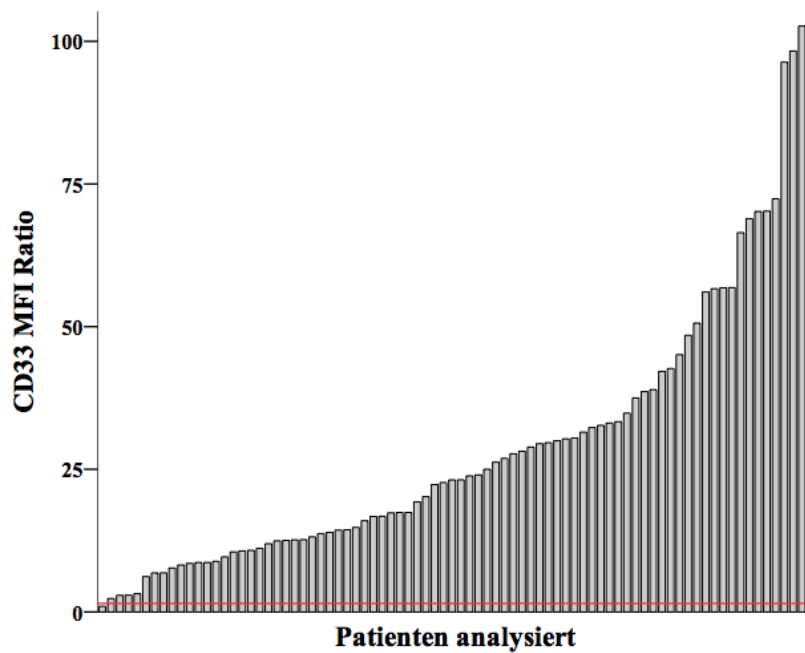
### 1.5. Akute Promyelozytenleukämie

Die zur Berechnung der MFI-Ratio nötige MFI der Isotypkontrolle ist in erheblichem Ausmaß von der sogenannten „Autofluoreszenz“ der Zellen abhängig. Die hohe Anzahl granulärer Bestandteile im Zytoplasma führt zu einer durchschnittlich mindestens dreifach so hohen Autofluoreszenz der APL Zellen. Daher musste bei der MFI Berechnung meist durch einen sehr hohen Wert dividiert werden. Der Mittelwert der MFI aller Isotypkontrollen von APL Patienten war 32,0, derjenige der höchsten nicht APL Gruppe 8,9 (FAB M2).



**Abbildung 21: Die MFI der Isotypkontrolle von APL Zellen (M3) war im Mittelwert mehr als dreimal so hoch wie die übrigen FAB-Typen.**

Um einen objektiven Vergleich zu den anderen AML Zellen zu gewährleisten, wurden Leukämien vom APL Typ daher separat betrachtet. Insgesamt hatten von 82 Patientenproben 81 eine MFI-Ratio über 1,5 und waren somit positiv für CD33. Bei einem Median von 23,1 lag die Spannweite aller Patientenproben zwischen MFI-Ratio 0,98 bis 168,2.



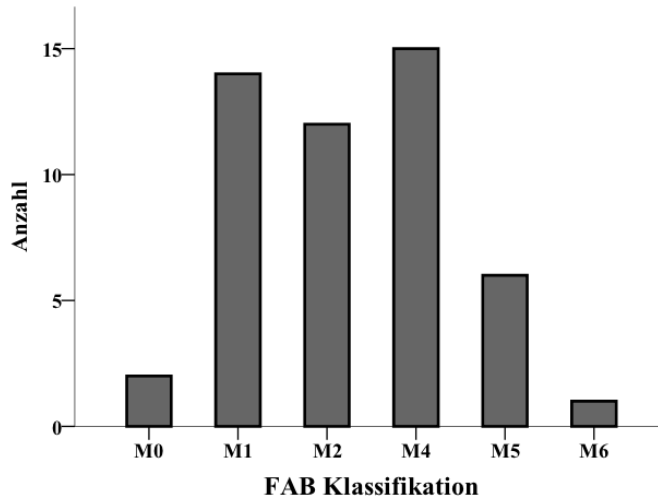
**Abbildung 22: 81 von 82 Patientenproben waren positiv für CD33 (die rote Linie markiert die MFI-Ratio von 1,5).**

## **2. CD33 Expressionsintensität auf Leukämie initiiierenden Zellen**

### **2.1. Kohorte der LIC Auswertung**

Von 92 Patienten mit AML wurden zwischen Juli 2012 und Juni 2013 Proben im Labor für Leukämiediagnostik gemessen. 77 Proben stammten dabei aus dem Knochenmark und 15 aus dem peripheren Blut. Die Messung fand bei 81 Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose statt. 11 befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Rezidiv. 48 Patienten waren weiblich und 44 männlich. Das mediane Alter lag bei 61 Jahren mit einer Spannweite von 19 bis 87 Jahren. 12 Patienten hatten eine sAML, 5 Patienten eine tAML und ein Patient eine APL. Die häufigsten Subgruppen der de-novo-AML Erstdiagnosen waren nach der FAB Klassifikation die Subgruppen M1, M2 und M4. Bei 24 Patienten lagen keine Angaben zur FAB Klassifikation vor. Im Median befanden sich 67,2% der Zellen im CD45 Gate und wurden entsprechend als Blasten gewertet. Die Sensitivität in der Diagnostik der minimalen Resterkrankung (Minimal Residual Disease)(MRD) mittels Durchflusszytometrie bei der akuten lymphoblastischen Leukämie liegt in etwa bei  $10^{-4}$  (Malec, Bjorklund et al. 2001) Dies wurde als Basis für die LIC Auswertung als Grenzwert akzeptiert, sodass nur

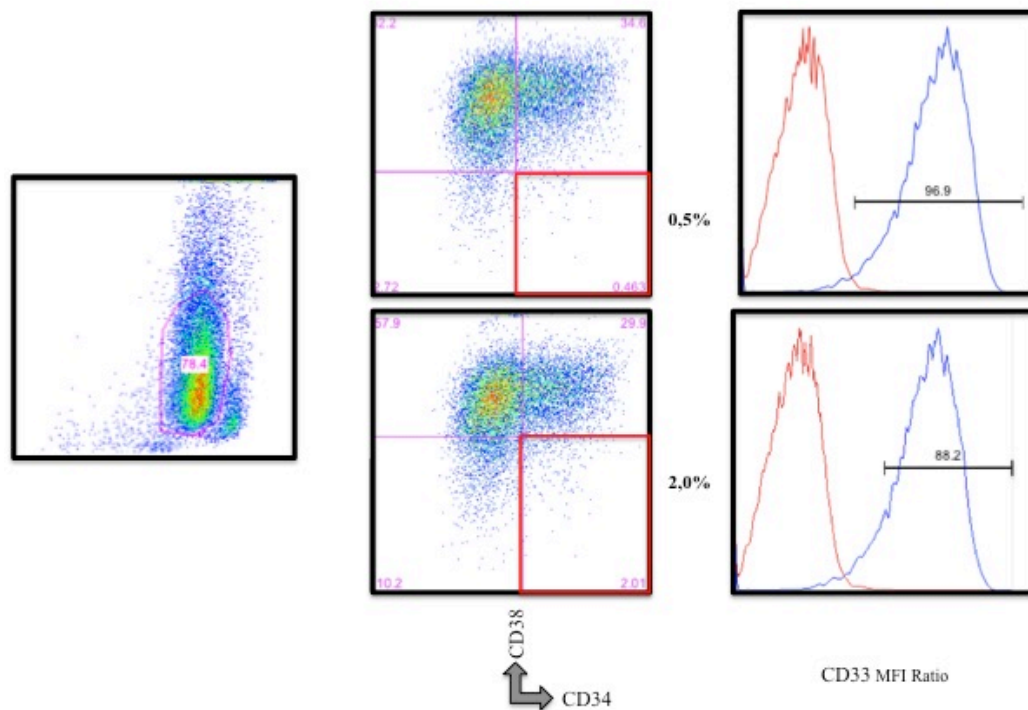
Patientenproben mit mindestens 40 Zellen im LIC Gate pro gemessener Probe mit 20000 gesamt aufgenommenen Zellen berücksichtigt wurden. Insgesamt konnten bei 44 der 92 Patienten mehr als 40 Zellen im CD34+/CD38- Gate gezählt und somit zur LIC Auswertung herangezogen werden.



**Abbildung 23: Einteilung von 50 Patienten nach der FAB Klassifikation (ausgeschlossen wurden FAB M3 (1), sAML (12) und tAML (5))**

## **2.2. Gatingstrategie und Definition von LIC**

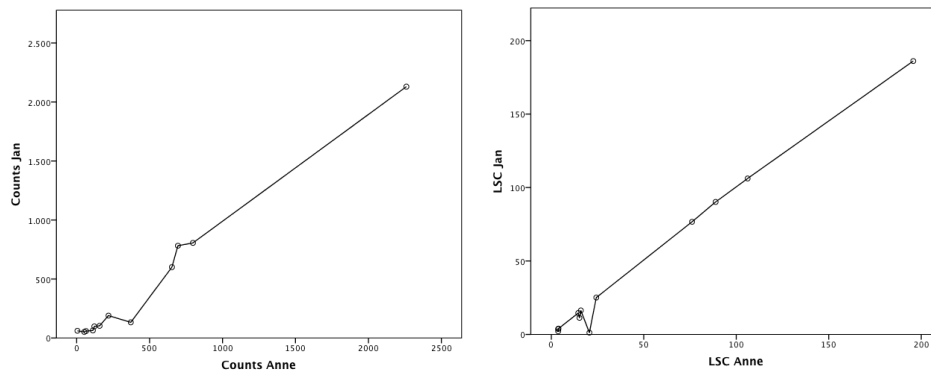
In dem Kompartiment der CD34+/CD38- Zellen werden die sogenannten LIC überwiegend erwartet. Für Zellen aus dem CD34+/CD38- Kompartiment konnte im Gegensatz zu Zellen aus den anderen Kompartimenten gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, in SCID Mäusen zu wachsen und in diesen eine akute Leukämie zu initiieren (Dick 2008). Dieses Kompartiment ist von anderen Zellen in den meisten Fällen nicht deutlich abgegrenzt und viele Patienten haben einen nur sehr geringen Anteil an LIC. Ziel war es, eine standardisierte Gatingstrategie zu entwickeln, um mit der Hilfe der Isotypkontrolle Vergleichbarkeit für alle Proben zu gewährleisten.



**Abbildung 24:** In der oberen Zeile wurde das Gate nach subjektivem Befunden festgelegt, in der unteren Zeile nach einer festgelegten Prozentzahl von Zellen außerhalb der Isotypkontrolle. In der ersten Methode werden viermal weniger Zellen als CD34+/CD38- Zellen gewertet und sie sind zu einem höheren Prozentsatz positiv.

Bei der oberen Reihe der dargestellten Grafik wurde ein Gate nach subjektivem Befunden gesetzt, bei der unteren Reihe nach der Methode das Gate in dem Fluoreszenzbereich zu setzen, bei dem nur 0,2% der Zellen in der Isotypkontrolle eine höhere Fluoreszenz aufweisen. Bei der 0,2% Methode wurden in dem Beispiel viermal so viele Zellen gezählt wie nach subjektiven Befunden und es waren nur 88,2% positiv für CD33 im Gegensatz zu 96,9% bei subjektiven Befunden. In vielen Fällen zeigte der Isotyp eine hohe Anzahl an Artefakten in Form zu hoher Fluoreszenz. Da das Gate in diesen Fällen sehr weit von der übrigen Isotypkontrolle verschoben wurde, fiel die Entscheidung, die Methode das Gate nach subjektivem Befunden festzulegen.

Um Fehler durch Untersuchervariabilität auszuschließen, wurden 17 Proben von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet. 5 Proben hatten weniger als 40 Zellen im CD34+/CD38- Kompartiment und wurden deshalb nicht mitgezählt. Bei Zellzahl ( $k=0,991$ ) und MFI ( $k=0,995$ ) der CD34+/CD38-Zellen konnten größtenteils Übereinstimmung gezeigt werden, sodass die Gatingstrategie nach subjektivem Befunden für die weitere Analyse gewählt wurde.



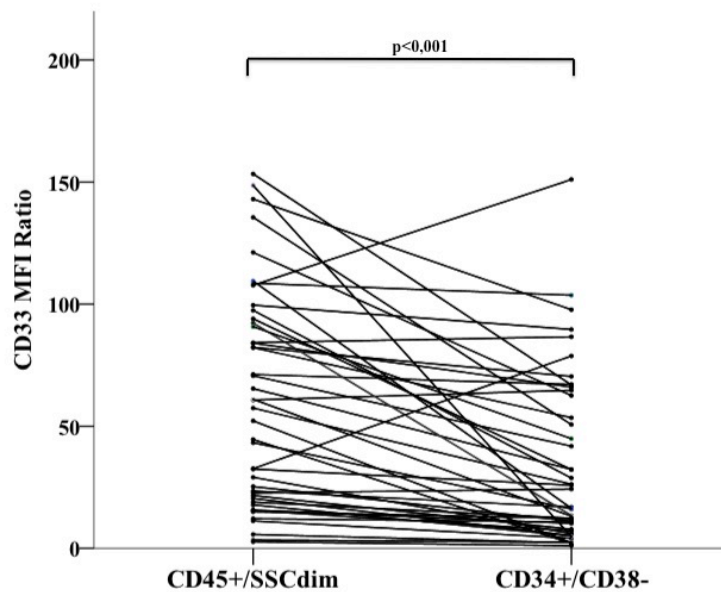
**Abbildung 25:** Bei 12 Proben bestand eine starke Korrelation zwischen den Ergebnissen von LSC (=LIC) Anzahl ( $k=0,991$ ) und MFI ( $k=0,995$ ) auf den LSC (=LIC) zwischen beiden Untersuchern.

### 2.3. Expressionsvergleich von AML- Gesamttumormasse und LIC

Im Gate (Gatingstrategie siehe Abschnitt 2.1.) der CD34+ /CD38- Zellen befanden sich zwischen 0 und 5193 Zellen. Der Median lag bei 32 Zell-Events. Damit wurden die 44 von 92 Proben bei der Auswertung berücksichtigt, die mehr als 40 Zellen, die bekannte Grenzmenge bei der MRD Diagnostik der ALL (siehe Methodenteil), im CD34+/CD38- Bereich aufwiesen.

Ob der Karyotyp normal oder aberrant war, zeigte keinen Unterschied in der Frequenz (Anzahl der Zellen/Events) der CD34+/CD38- Population ( $p=0,80$ ). Auch bei den 13 Patientenproben mit normalen Karyotyp bestand kein Unterschied der Zellzahl in Abhängigkeit von den molekularen Markern *NPM1* ( $p=0,70$ ) und *FLT3-ITD* ( $p=0,75$ ).

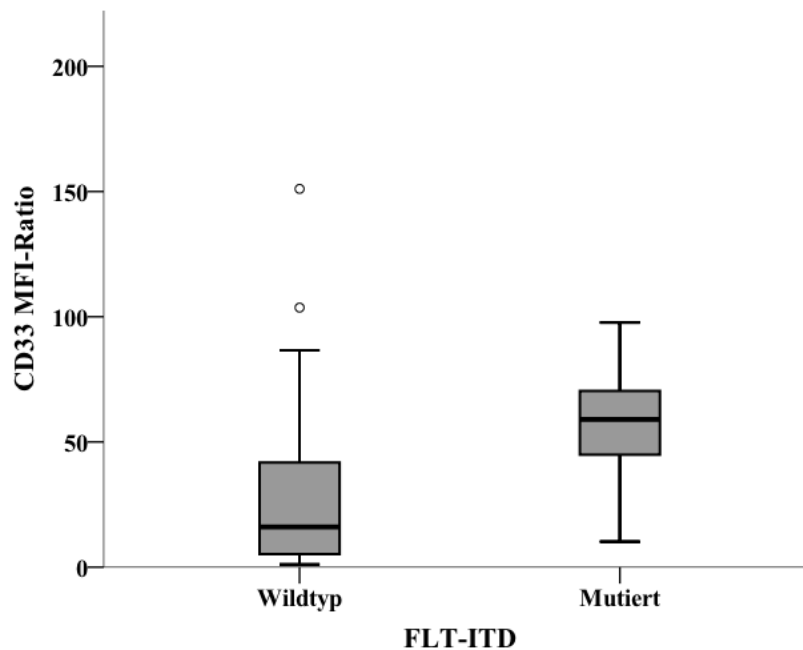
39 von 44 Patienten hatten eine niedrigere CD33 MFI-Ratio im LIC Kompartiment. Damit war die CD33 Expression bei der deutlichen Mehrzahl der Patienten höher auf den AML Bulk als auf den Zellen im LIC Kompartiment. Insgesamt ergab sich ein Median von 59,1 auf der Gesamtheit der AML Zellen und 20,1 bei den LIC. Dieser Unterschied ist signifikant ( $p<0,001$ ). Durchschnittlich war die Expression auf der Gesamttumormasse im Vergleich zu den LIC um den Faktor 4 höher (Faktor 3,79). Es hatte nur ein Patient eine MFI-Ratio von unter 1,5 und galt damit als negativ für CD33.



**Abbildung 26:** Bei 43 von 44 Patienten waren die LIC CD33 positiv und zeigten eine niedrigere CD33 Expression mit einem Median von 20,1 im Vergleich zum AML Bulk Zellen ( Median = 59,1) (Krupka, Kufer et al. 2014).

Bei 38 Patienten mit vorliegenden Daten zur Zytogenetik zeigte sich keine eindeutige Assoziation zur CD33 Expression. So ergab sich kein Unterschied, ob der Karyotyp normal (n=13) oder aberrant (n=26) war (p=0,295). Auch ein komplexer Karyotyp, der bei 13 Patienten nachgewiesen werden konnte, zeigte keinen signifikanten Unterschied in Korrelation zur CD33 Expressionsintensität (p=0,142). Für *NPM1* Mutationen konnten die höheren Expressionslevel aus der Auswertung der AML Bulk Zellen nicht auf LIC übertragen werden (p=0,284).

Bei 10 von 39 Patienten mit einer *FLT3-ITD* Mutation war die Expression von CD33 signifikant höher (p=0,016). Auch bei Eingrenzung auf Patienten mit normaler Zytogenetik ist diese Beobachtung signifikant (p=0,048) (n=12; 5 mutiert/ Wildtyp).



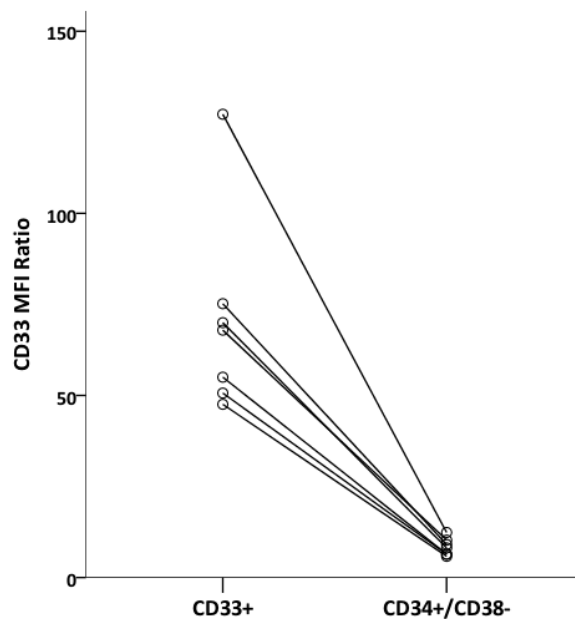
**Abbildung 27:** Auf den LIC von 10 Patienten mit *FLT3-ITD* war die Expression von CD33 signifikant höher ( $p=0,016$ ) als auf den LIC von nicht mutierten Patienten.

#### 2.4. Expression von CD33 auf gesunden hämatopoetischen Stammzellen

Bei sieben gesunden Knochenmarksspendern wurde die Expression von CD33 auf CD34+/CD38- HSCs gemessen. Weitere fünf Probanden wurden nicht berücksichtigt, da im Bereich der CD34+/CD38- Zellen weniger als 40 Zellen gemessen wurden. Bei den Zellen von gesunden Knochenmarksspendern werden in diesem Kompartiment insbesondere Zellen mit den Eigenschaften von hämatopoetischen Stammzellen erwartet (Terstappen, Huang et al. 1991). Um die unerwünschte Toxizität von antikörperbasierten Immuntherapien gegen CD33 auf normalen hämatopoetischen Zellen zu verhindern, sollte sich die Expression von CD33 also überwiegend auf Leukämiezellen beschränken.

Myeloische Vorläuferzellen und Monozyten werden mit einer hohen CD33 Expression beschrieben (Yang, Greenwood et al. 2005), sodass bei den gesunden Spendern CD33 positive Zellen mit den CD34+/CD38- Zellen verglichen wurden. Der Median der MFI-Ratio von allen CD33 positiven Zellen lag bei 67,9, während der Median der CD34+/CD38- Zellen bei 8,1 lag ( $p=0,02$ ) und damit mehr als achtmal niedriger. Die MFI-Ratio der CD34+/CD38- Zellen gesunder Spender war ebenso deutlich niedriger als die MFI-Ratio der LIC ( $p=0,047$ ).





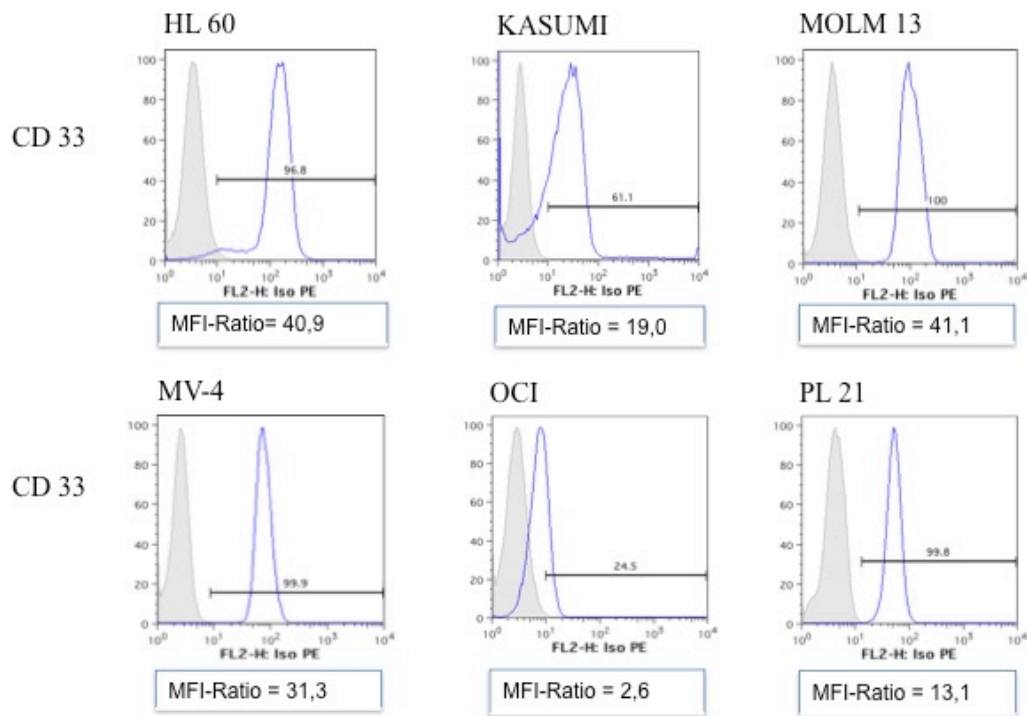
**Abbildung 28:** Im Kompartiment der CD34+/CD38- Zellen war die CD33 Expression bei gesunden Knochenmarksspendern im Mittelwert mehr als achtmal niedriger als auf den übrigen myeloischen und monozytären CD33+ Zellen ( $p=0,02$ ) (Krupka, Kufer et al. 2014).

## 2.5. CD33 Expression auf AML Zelllinien

Die MFI-Ratio wurde auf sechs verschiedenen AML Zelllinien analysiert. Die untersuchten Expressionslevel waren unterschiedlich. Dabei zeigten HL60 und MOLM13 die höchste Expression, gefolgt von MV-4. Im mittleren Bereich befanden sich Kasumi und PL21. Die Zelllinie mit der niedrigsten CD33 Expression war OCI-AML3, bei der nur 24,5% der Zellen CD33 positiv waren und die MFI-Ratio 2,6 betrug.

Zelllinie:	HL 60	KASUMI	MOLM 13	MV-4	OCI-AML3	PL 21
MFI-Ratio:	40,9	19,0	41,1	31,3	2,6	13,1

**Tabelle 4:** MFI-Ratio auf verschiedenen AML Zelllinien



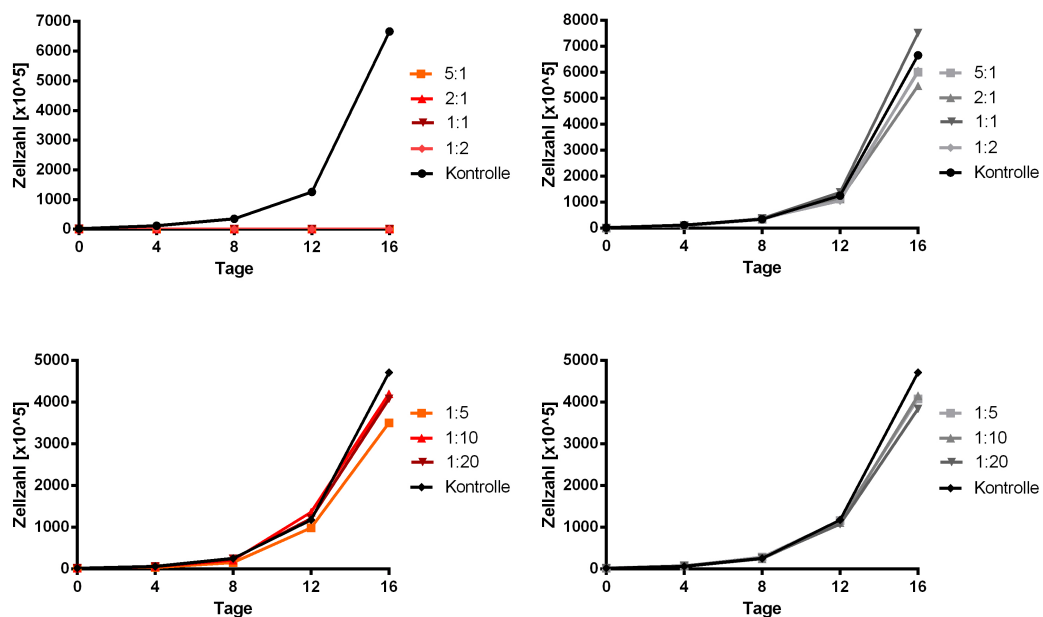
**Abbildung 29: Die AML Zelllinien zeigten eine unterschiedlich hohe CD33 Expressionsintensitäten.**

### 3. Zytotoxizität des bispezifischen CD33/CD3 Antikörper AMG 330

#### 3.1. AMG 330 medierte Zytotoxizität auf AML Zelllinien

Für eine effiziente Eliminierung der Antigen-exprimierenden Zellen durch AMG 330 muss ein geeignetes Verhältnis von Effektor zu Zielzellen in der Zellkultur vorliegen (Effektor zu Targetzell Ratio = E:T). In den folgenden Versuchen war das Ziel, eine geeignete Anzahl von Effektor zu Targetzellen für eine effektive Zelllyse der AML Zellen bei Zugabe des bispezifischen Antikörpers AMG330 zu bestimmen. In den E:T Ratios zwischen 5:1 und 1:20 wurden OCI-AML3 Zellen mit gesunden Spender PBMCs für insgesamt 16 Tage kokultiviert und alle 4 Tage die Eliminierung der CD33+ AML Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach 4 Tagen wurde bei E:T Ratios 5:1, 2:1, 1:1 und 1:2 eine komplette Eliminierung der CD33+ OCI-AML3 Zellen durch AMG 330 aktivierte T Zellen beobachtet. In den Kulturen mit Kontrollantikörper hingegen wurde eine stetige Proliferation der AML Zellen beobachtet. Ab einem E:T Ratio von 1:5 konnte

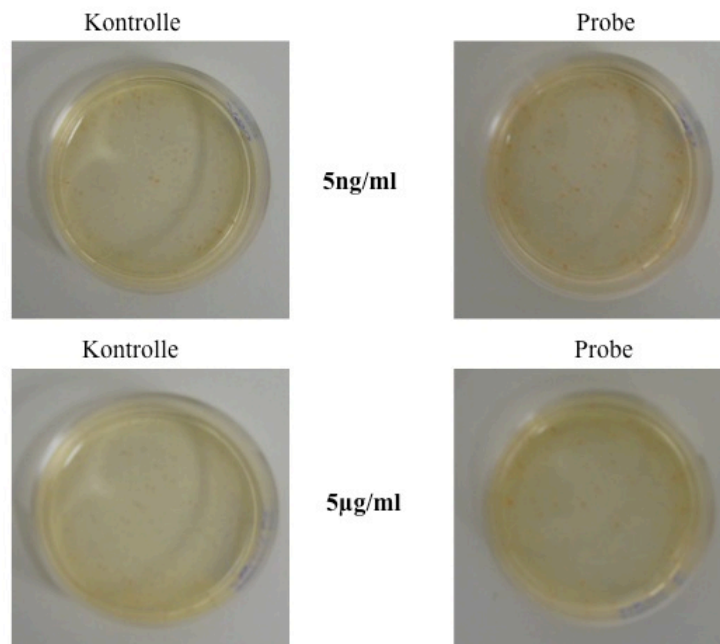
allerdings keine AMG 330 medierte Zytotoxizität gegenüber OCI-AML 3 Zellen mehr beobachtet werden. Aufgrund der starken AML Zell Proliferation mussten die Kulturen alle 4 Tage in der Zellzahl reduziert und mit neuem Medium versorgt werden (Splitting). Dies führte unweigerlich auch zu einer Reduktion der Effektorzellen in der jeweiligen Kultur und das E:T Ratio hatte sich dabei zugunsten der AML/ Target Zellen verschoben.



**Abbildung 30:** In den E:T Verhältnissen 5:1 bis 1:2 fand nach Zugabe von AMG 330 (rote Linie) und gesunden Spender PBMC eine vollständige Eliminierung der stark proliferativen Zelllinie OCI-AML3 statt. In den Verhältnissen 1:5 bis 1:20 konnten die Zellen dagegen in einer mit der Kontrollprobe vergleichbaren Geschwindigkeit proliferieren.

### 3.2. Toxizität auf gesunde hämatopoetische Stammzellen

Um die ungewünschte Toxizität von AMG 330 auf gesunde Knochenmarkszellen zu untersuchen, wurden CD34+/Lin- Zellen aus der Knochenmarkspröbe eines gesunden Spenders zusammen mit 5ng/ml oder 5µg/ml AMG 330 oder Kontrollantikörper in jeweils Duplikaten für 48 Stunden kultiviert. Im Anschluss wurden alle Proben, im semi-solidem Methylzellulose Medium, inkubiert und die Koloniebildung über 14 Tage beobachtet. Diese Versuchsreihe wurde mit Christina Krupka im Helmholtz-Zentrum München durchgeführt.



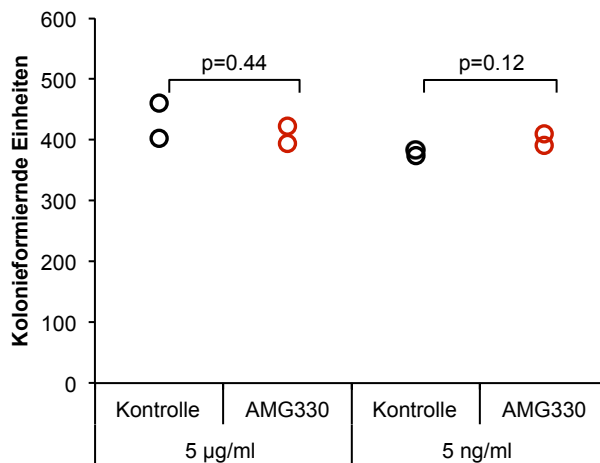
**Abbildung 31:** Nach Inkubation von AMG330 oder Kontrollantikörper mit CD34+/Lin- Zellen eines gesunden Spenders zeigte sich, unabhängig von der Konzentration, kein Unterschied in der Toxizität.

Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Koloniezahl zwischen AMG 330 und Kontrollantikörper behandelten Knochenmarksproben, unabhängig von der Antikörperkonzentration. In der Konzentration von 5ng/ml waren 410 bzw. 391 Einheiten zu beobachten, im Gegensatz zu 384 und 374 auf der Kontrollplatte ( $p=0,44$ ). Bei der höheren Antikörperkonzentration von 5 µg/ml waren 423 und 394 Einheiten, in der Kontrolle 403 und 460 ( $p=0,12$ ) zu zählen.

	5ng/ml (1)	5ng/ml (2)	5 µg/ml (1)	5µg/ml (2)
<b>AMG 330</b>	410	391	423	394
<b>Kontrolle</b>	384	374	403	460

**Tabelle 5: Anzahl der auszählbaren Einheiten**

Die Konzentration von 5 µg/ml war eine sehr hohe Konzentration, die deutlich über der für einen klinischen Gebrauch angedachten Serumdosis von AMG 330 liegt. Für die Konzentration von 5ng/ml liegen Daten zur Ermittlung der Dosis aus Studien mit Affen vor, welche allerdings gegenwärtig nicht publiziert wurden und somit nur als mündliche Empfehlung vorliegen.



**Abbildung 32: Kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von Kolonieformierenden Einheiten nach Vorinkubation von Knochenmarkszellen eines gesunden Spenders mit AMG 330 oder einem Kontrollantikörper in den Konzentrationen 5ng/ml ( $p=0,44$ ) und 5µg/ml( $p=0,44$ ) (Krupka, Kufer et al. 2014).**

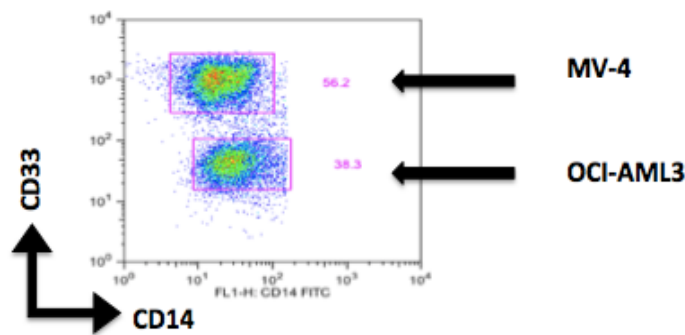
#### **4. Kinetik der AMG 330 antikörpervermittelten Zytotoxizität von AML Zellen in Abhängigkeit der CD33 Expression**

In der viertägigen Mixkultur mit der Zelllinie MV4-11 mit hoher CD33 Expression und der Zelllinie OCI-AML3 mit niedriger CD33 Expression sollte die Hypothese geprüft werden, dass gemeinsam mit PBMCs von gesunden Spendern und AMG 330 eine präferentielle Zelllyse der CD33 hoch-exprimierenden Zellen/ CD33<sub>bright</sub> (MV4-11) stattfindet. Die mehr als zehnmal so hohe Expression von CD33 auf der Oberfläche von MV4-11 Zellen könnte eine höhere Effektivität des Antikörpers bei MV4-11 Zellen bedeuten. (MFI-Ratio von MV4-11: 31,3; von OCI-AML3: 2,6).

Um Unterschiede und somit Fehler in den Kulturbedingungen der jeweiligen Wells und Wellplatten zu verhindern, wurde, in einer gemeinsamen Etablierung und Ausführung der Versuche mit Christina Krupka, eine Mixkultur gewählt. Nachdem in den Titrationsversuchen eine effektive Zelllyse mit E:T Ratios zwischen 5:1 und 1:2 gezeigt werden konnte, ab 1:5 jedoch keine Zelllyse mehr stattfand, wurde für den Versuch mit zwei verschiedenen Zelllinien in einer gemeinsamen Mixkultur die E:T Ratio 1:1, 1:2, 1:3 und 1:4 gewählt. Die Messzeitpunkte waren, mit den gewählten Zeitpunkten nach 15,24, 48, 72 und 96

Stunden, häufiger als in den Titrationsversuchen, da bei einem hohen E:T Ratio nach vier Tagen bereits eine komplette Eliminierung der AML Zellen stattfand.

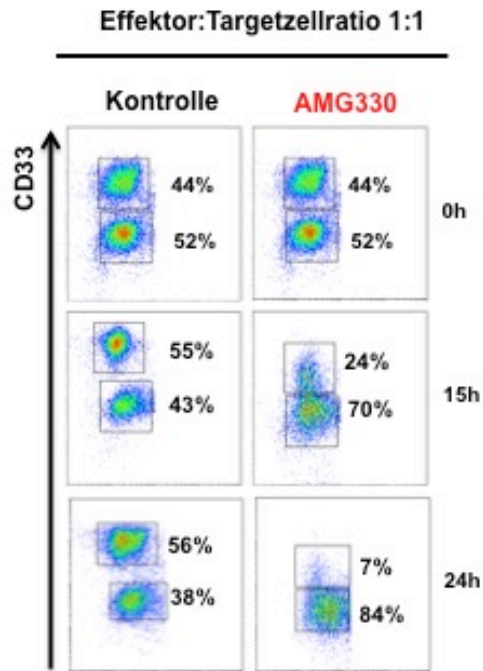
Beide Populationen wurden an den angegebenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie anhand der unterschiedlichen CD33 Expressionslevel differenziert.



**Abbildung 33: OCI-AML3 (CD33<sub>dim</sub>) und MV4 (CD33<sub>bright</sub>) Zellen wurden anhand der unterschiedlichen CD33 Expression mittels Durchflusszytometrie unterschieden.**

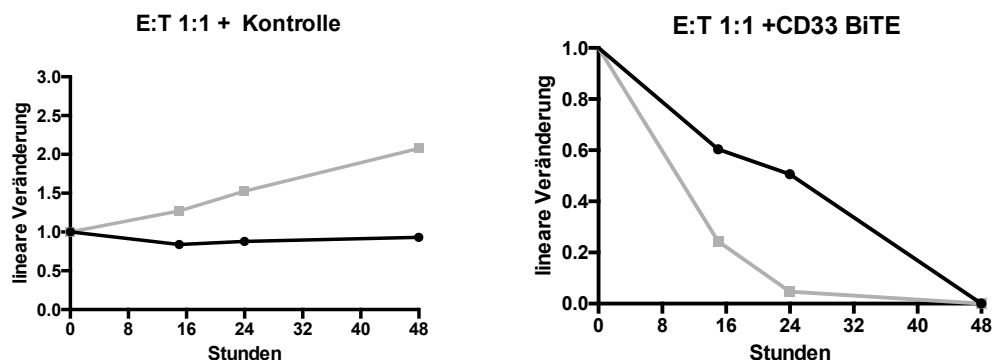
Der Anteil beider Zellpopulationen wurde zum Zeitpunkt Null als je 100 Prozent (Ausgangswert: 1) definiert. Nach 15 Stunden war von den OCI Zellen nur noch 60,4 Prozent und nach 24 Stunden 50,6 Prozent zu detektieren. Von den MV4-11 Zellen waren nach 15 Stunden noch 24,4 Prozent und nach 24 Stunden nur noch 4,7 Prozent der ursprünglichen Zellzahl zu beobachten. Auch in der Berechnung der absoluten Zellzahlen war ein deutlich schnellerer Rückgang der CD33<sub>bright</sub> AML Zellen im Vergleich zu den CD33<sub>dim</sub> zu verzeichnen. Nach 48 Stunden hatte bei beiden Zelllinien eine fast vollständige Elimination stattgefunden und es konnte kein Unterschied zwischen CD33<sub>bright</sub> und CD33<sub>dim</sub> Zellen mehr festgestellt werden.

In den Kulturen mit Kontroll-BiTE<sup>®</sup> Antikörper proliferierten die MV4-11 Zellen leicht (15 Stunden: 127%; 24 Stunden: 152%). Die Anzahl der OCI-AML3 Zellen sank bzw. stagnierte im Verlauf leicht (nach 15 Stunden: 83,9%; 24 Stunden: 87,9%). Es zeigte sich insgesamt keine Zelllyse. Es fiel eine schnellere Proliferation der MV4-11 Zellen im Vergleich zu OCI-AML3 Zellen auf, sodass die Effektivität der antikörpervermittelten Zytotoxizität durch die Präsenz von AMG 330 nicht durch Kulturbedingungen verfälscht wurde.



**Abbildung 34:** In den Messungen nach 15 und 24 Stunden konnte bereits eine deutlich schnellere Zelllyse der CD33<sup>bright</sup> (MV4-11) Zellen im Vergleich zu den CD33<sup>dim</sup> (OCI-AML3) Zellen beobachtet werden. Je stärker sich die E:T zugunsten der Effektorzellen verschob, desto schneller war die Zelllyse der Zellen. In der unten abgebildeten Mixkultur mit Kontroll-BiTE<sup>®</sup> fand keine Zelllyse statt (Krupka, Kufer et al. 2014).

Die Beobachtungen im E:T Ratio von 1:1 zeigte sich auch in den übrigen E:T Ratios: In allen Kulturen war ebenfalls eine begünstigte Zelllyse der MV4-11 Zellen messbar, dabei allerdings weniger deutlich als im Verhältnis 1:1 (siehe Tabelle). In den Konditionen mit Kontroll-BiTE<sup>®</sup> wurde dagegen keine Zelllyse der AML Zellen beobachtet.



**Abbildung 35: Kinetik bei einem E:T Ratio von 1:1 : Schnellere Zelllyse der CD33<sup>bright</sup> MV4-11 Zellen im Vergleich zu OCI-AML3 Zellen durch AMG 330 und den PBMCs eines gesunden Spenders. Am deutlichsten ist der Unterschied bei der hier abgebildeten E:T Ratio von 1:1 nach 15 und 24 Stunden. Bereits nach 48 Stunden sind alle Zellen lysiert. In der Probe mit Kontroll-BiTE<sup>®</sup> zeigte sich dagegen keine Zelllyse (Krupka, Kufer et al. 2014).**

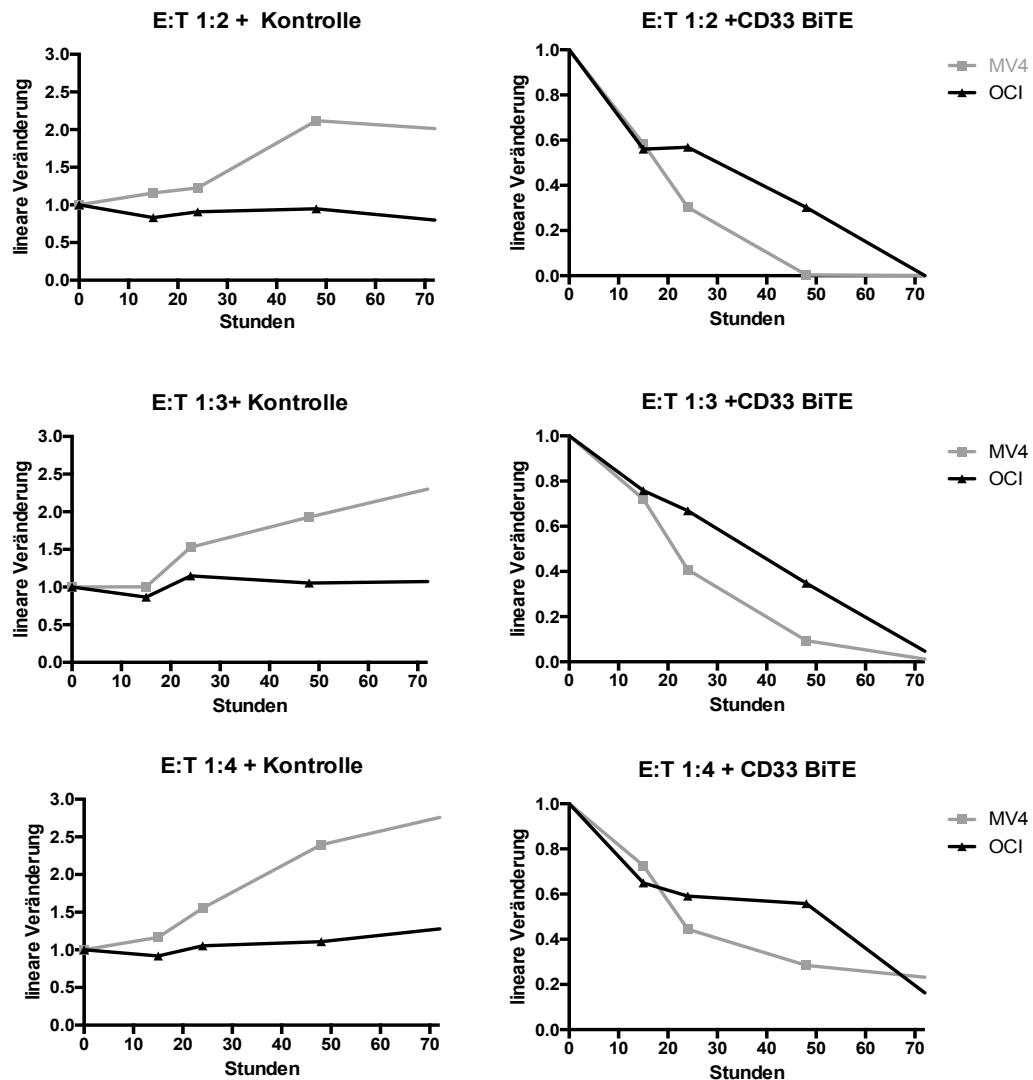
**Zeit:** MV-11   OCI   MV-11   OCI   MV-11   OCI   MV-11   OCI

	E:T = 1:1		E:T = 1:2		E:T = 1:3		E:T = 1:4	
<b>0 h</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>15 h</b>	24,4%	60,4%	58,5%	56,0%	72,0%	75,8%	72,6%	65,0%
<b>24 h</b>	4,7%	50,6%	30,3%	56,9%	40,8%	66,9%	44,5%	59,1%
<b>48 h</b>	0%	0%	0,4%	30,2%	9,4%	34,8%	28,5 %	55,8 %
<b>72 h</b>	0%	0%	0%	0%	1,2%	4,7%	23,2%	16,3%

**Tabelle 6: Unterschiedliche Kinetik der Zelllyse in Prozent in verschiedenen E:T Ratios bei Zugabe von AMG 330 zur Kultur**

Die Hypothese eine hohe Antigenexpression von CD33 auf der Oberfläche der Targetzellen führe zu einer schnelleren Lyse der Zellen konnte in diesem Modell bestätigt werden. Sollte die Effektivität von AMG 330 auch bei AML Zellen in vivo diese präferierte Zelllyse der hoch exprimierenden Zellen zeigen, könnten die Kenntnisse über die Expression der AML Zellen entscheidende Hinweise über die Ansprechdynamik der AML auf den Antikörper liefern.





**Abbildung 36: Schnellere Zelllyse der CD33<sub>bright</sub> MV4-11 Zellen im Vergleich zu OCI-AML3 Zellen durch AMG 330 und den PBMC eines gesunden Spenders. Abgebildet sind die E:T Ratios 1:2, 1:3 und 1:4. Aufgrund bereits vollständiger Zelllyse der Zellen ist die Messung nach 96 Stunden grafisch nicht berücksichtigt worden. In den Konditionen mit Kontroll-BiTE<sup>®</sup> auf der jeweils rechten Seite zeigt sich keine Lyse der Zellen. Dabei proliferieren die MV4 Zellen in allen E:T Ratios schneller als die OCI-AML3 Zellen.**

## V. DISKUSSION

### 1. CD33 Expression

Trotz des hohen Bestrebens in der Erforschung neuer Therapieansätze hat sich die Prognose der AML in den letzten Jahren kaum verbessert. Die einzige kurative Therapie ist in den meisten Fällen die allogene Blutstammzelltransplantation, für die viele, insbesondere ältere Patienten, aufgrund einer erhöhten Rate an Therapie assoziierter Mortalität nicht in Frage kommen (Ustun, Lazarus et al. 2013). Antikörperbasierte Immuntherapien mit bispezifischen Antikörpern stellen vielversprechende alternative Therapieansätze dar und konnten bei anderen hämatologischen Erkrankungen bereits klinische Erfolge zeigen. Seit Dezember 2014 besteht für den bispezifischen CD3-CD19 Antikörper Blinatumomab eine Zulassung für Patienten mit einer therapierefraktären oder rezidierten B-ALL durch die FDA (US Food and Drug Administration), seit September 2015 auch der EMA (European Medicines Agency).

Basierend auf den vielversprechenden Daten mit Blinatumomab war die Entwicklung eines bispezifischen Antikörpers gegen myeloische Neoplasien der nächste Schritt, um ein vergleichbar effektives Medikament für AML Patienten zu generieren. Mit dem CD33-CD3 Antikörper AMG 330 konnte ein analoges Molekül für die AML entwickelt werden.

Das Zielantigen von AMG 330 ist mit CD33 das am meisten erforschte Target für antikörperbasierte Therapien der AML (Laszlo, Estey et al. 2014). Im Gegensatz zur Elimination quasi aller B-Lymphozyten bei der Immuntherapie von B-Zell Erkrankungen, kann die Elimination von benignen myeloischen Zellen nur eine kurze Zeit ohne lebensbedrohliche Komplikationen toleriert werden (Topp, Gokbuget et al. 2015). Die Herausforderungen an ein sicheres Zielantigen für AML Patienten sollte daher im Idealfall das Antigen auf gesunden Zellen aussparen, während es auf der malignen Hämatopoese exprimiert wird, mindestens jedoch einen deutliche Diskrepanz in der Menge an Oberflächenantigenen auf den Zellen zeigen.

CD33 ist bei AML Patienten zwar stark, aber in heterogener Intensität auf der Oberfläche der leukämischen Zellen nachzuweisen. Die vorliegende Dissertation

zeigt das differenzielle Expressionsprofil von CD33 zwischen den genetischen und molekularen Subgruppen von AML Patienten und innerhalb des Kompartiments von CD 33 positiven Zellen des einzelnen Patienten. In der Arbeit konnte die unterschiedliche Lysekinetik durch AMG 330, in Abhängigkeit des Expressionsprofil, gezeigt werden. Diese Daten könnten eine Hypothese für das unterschiedliche Therapieansprechen bei Patienten mit Anti-CD33 basierten Immuntherapien seien, welche allerdings andere Antikörperformate als AMG 330 erhalten haben (Hills, Castaigne et al. 2014). Ob die Ergebnisse mit dem bispezifischen Antikörper auch Relevanz in der Klinik besitzen, werden schließlich allerdings erst die *in vivo* Erfahrungen der Zukunft zeigen.

### **1.1. CD33 Expressionsintensität auf AML**

Die Berechnung der CD33 MFI-Ratio auf AML Zellen gewährleistete einen Vergleich der Expressionsintensitäten zwischen verschiedenen Patienten. Anstatt, wie bisher meist üblich, nur die Prozentzahl positiver Zellen zu beurteilen (Burnett, Hills et al. 2011), wurde in unserer Auswertung die Intensität, also die Stärke der Expression von CD33 im Vergleich zum Ausmaß vom Hintergrundsignal des Primärantikörpers (Isotypkontrolle) bestimmt. Da unterschiedliche Autofluoreszenzen zwischen Patientenproben zu unterschiedlichen Messergebnissen bei gleicher Expressionsstärke führen können, wurde in dieser Auswertung durch die MFI der Isotypkontrolle dividiert (Pollard, Alonzo et al. 2012, Krupka, Kufer et al. 2014)

### **1.2. Die Korrelation zwischen Expressionsintensität , Prognosefaktoren und klinischen Ergebnissen**

Die vorliegende Arbeit beinhaltet eine umfassende Analyse der Expression von über 700 AML Patienten. Nachdem Patienten mit einer APL separat betrachtet wurden, konnten 621 nicht APL Patientenproben miteinander verglichen werden. Interessanterweise korrelierte die CD33 MFI-Ratio mit relevanten Prognosefaktoren(Krupka, Kufer et al. 2014).

Bei Patienten mit normalen Karyotyp war eine NPM1 Mutation sowohl mit oder ohne FLT3-ITD Mutation mit einer hohen CD33 Expression assoziiert und konnte so Ergebnisse einer vorherigen Studie mit 99 Patienten bestätigen (De Propriis, Raponi et al. 2011). Die höhere Expression könnte einer der Gründe für ein effektives Ansprechen von GO in einer klinischen Phase 3 Studie bei Patienten

mit einer NPM1 Mutation sein (Castaigne, Pautas et al. 2012). Patienten mit normalem Karyotyp und einer NPM1 Mutationen ohne zusätzliche FLT3-ITD haben eine günstige Prognose und die Empfehlung in den meisten Studien ist für diese Patienten eine intensive Therapien ohne allogene Knochenmarkstransplantation (Kanate, Pasquini et al. 2014). Ein antikörperbasierte Therapie gegen CD33 als Zielantigen, könnte in diesem Patientenkollektiv daher zusätzlich zur Induktions- oder Konsolidierungstherapie angewendet werden, wie es beispielsweise mit zusätzlichem GO in der 2009 geöffneten AMLSG 09-09 Phase 3 Studie untersucht wird.

Patienten mit einer alleinigen FLT3-ITD hatten keine erhöhte CD33 Expression auf den AML Zellen (Krupka, Kufer et al. 2014). Für den Fall, dass neben der NPM1 Mutation auch eine interne Tandemduplikation der FLT3 vorliegt, überwiegt der negative Einfluss der FLT3-ITD (Port, Bottcher et al. 2014). Diese Patienten haben in der Regel eine Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation und die Anwendung von CD33 Antikörpern sollte in diesem Kontext betrachtet werden. Grundsätzlich erscheint auch der Einsatz vor oder während der Konditionierungsphase, sowie als Konsolidation nach einer allogenen Blutstammzelltransplantation für CD33 basierte Immuntherapien vorstellbar.

Niedrige CD33 Expressionen waren hoch signifikant mit einem komplexen Karyotyp assoziiert (Krupka, Kufer et al. 2014). Dies könnte die niedrigen Ansprechraten von GO in der Gruppe mit ungünstiger Zytogenetik in einer Phase 3 Studie erklären (Burnett, Hills et al. 2011). Andere als ungünstig beschriebene oder nicht klassifizierte zytogenetische Veränderungen ließen sich aufgrund der niedrigen Prävalenz nicht gut einzeln auswerten und bilden gemeinsam eine heterogene Gruppe.

Core Binding Factor (CBF) Leukämien, mit günstiger Prognose klassifizierte Leukämien, zeigten je nach Karyotyp t(8/21) oder inv(16) unterschiedliche, zum Teil niedrige Expressionsprofile (Krupka, Kufer et al. 2014). Ein schlechteres Ansprechen war in bisherigen klinischen Studien allerdings nicht nachgewiesen worden (Burnett, Hills et al. 2011, Castaigne, Pautas et al. 2012). Vielmehr zeigte sich der gegenteilige Fall: Es konnte ein gutes Ansprechen von CBF Leukämien bei der zusätzlichen Gabe von GO zur Zytostatika basierten Induktions und Konsolidierungstherapie (FLAG), unabhängig vom Subtyp der CBF Leukämie in

einer im Jahr 2014 veröffentlichten Studie gezeigt werden (Borthakur, Cortes et al. 2014). Diese Ergebnisse müssen nicht in Diskrepanz zu der beobachteten niedrigen CD33 Expression bei Patienten mit CBF Leukämien stehen. CBF Leukämien gehen mit einer hohen Sensibilität gegen Chemotherapeutika einher und eine CD33 gerichtete Therapie könnte daher bei diesen AML Subgruppen auch bei niedrigen CD33 Expressionsleveln einen suffizienten Therapieeffekt haben (Solh, Yohe et al. 2014). Im in vitro Versuch zeigte sich so auch bei einer kleinen Fallzahl ein effektiver und zytotoxischer Effekt von AMG 330 auf AML Blasten von CBF Leukämien (Harrington, Gudgeon et al. 2015).

Eine ausführliche Analyse, die Expressionslevel mittels MFI zu analysieren, wurde bereits bei der kindlichen AML durchgeführt (Pollard, Alonzo et al. 2012). Bei Unterschieden in der Auswertung sollte die abweichende Biologie der kindlichen AML beachtet werden. Übereinstimmend mit den vorliegenden Daten waren NPM1 Mutationen und ein normaler Karyotyp mit hohen CD33 Expressionen assoziiert, eine Translokation t(8/21) mit einer niedrigen Expression (Krupka, Kufer et al. 2014). Diskrepanzen zeigten sich bei inv(16), welche in der Studie mit niedriger Expression assoziiert war und FLT3-ITD mit einer vorwiegend hohen Expression. Bei annähernd vollständigen Daten zur Zytogenetik sollte kritisch bemerkt werden, dass bei vielen kindlichen Patienten keine Daten zu molekularen Mutationen vorlagen oder sie unabhängig vom Karyotyp und damit der Prognose betrachtet wurden. Dies könnte Unterschiede zu der hier dargestellten Auswertung erklären.

Die FAB Subgruppen M4 und M5 mit myelomonozytären bzw. monozytären Ursprung zeigten hohe CD33 Expressionen. Für die Subgruppe der FAB M4 und M2 wurde bisher meist die Tendenz zu einer günstigen Prognose beschrieben, während die Subgruppen M0,M1,M5, M6 und M7 eher mit einer schlechten Prognose assoziiert wurden (Oosterveld, Suciú et al. 2014). Die prognostische Relevanz der FAB Einteilung wird aber kritisch gesehen. So könnte zum Beispiel die häufigere Prävalenz einer inv(16) in der Subgruppe M4 den Effekt eines statistischen Störfaktors besitzen (Estey, Thall et al. 1997, Eghtedar, Borthakur et al. 2012). Insgesamt wird die Einteilung nach FAB, bei einem zunehmenden Verständnis der molekularen Pathologiemechanismen, immer weniger beachtet, sodass sie in der Gewichtung der hier vorliegenden Untersuchungen und Schlussfolgerungen ebenfalls eine untergeordnete Rolle spielt.

In den Klassifikationen nach ELN und MRC waren die günstige und ungünstige Gruppe mit höheren Expressionen assoziiert. Beide Klassifikationen berücksichtigen vorwiegend Änderungen der Zytogenetik. Die ELN Klassifikation unterscheidet zusätzlich noch nach molekularen Veränderungen bei Patienten mit normalen Karyotyp. Parallelen in den Ergebnissen waren demnach zu erwarten. Die Beobachtungen der Expressionsunterschiede innerhalb der Klassifikationen können eventuell den ausbleibenden Benefit von Patienten der ungünstigen Gruppe im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen in einer klinischen Phase III Studie mit GO erklären (Burnett, Hills et al. 2011). In einer großen Metanalyse mit über 3000 Patienten wurde der Langzeitüberlebensvorteil der günstigen und intermediären Gruppen bei zusätzlicher Gabe von GO zur Induktionstherapie mit Cytarabin und Anthrazyklinen eindrucksvoll bestätigt (Hills, Castaigne et al. 2014).

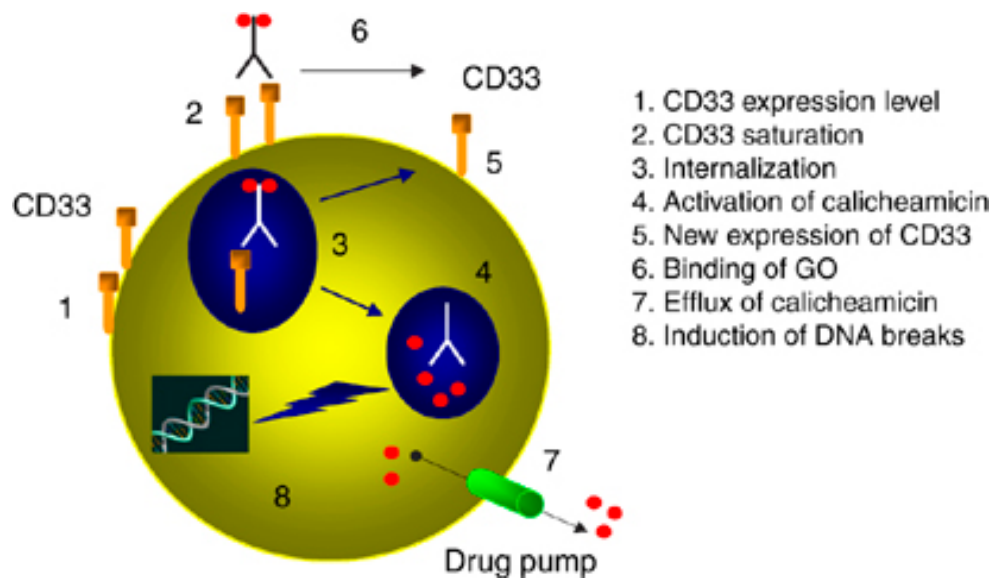
### **1.3. CD33 in der Promyelozytenleukämie (APL)**

Aus einigen präklinischen Beobachtungen und Überlegungen wurde die Hypothese erstellt, eine effektive Therapie mit CD33 Antikörpern sei besonders bei AML Subgruppen wie der APL effektiv, die aus gemeinsamen reiferen Vorläuferzellen entstanden sind (Walter, Appelbaum et al. 2012). Tatsächlich konnte bei einer Monotherapie mit GO bei APL Patienten im ersten Rezidiv eine hohe Effektivität erreicht werden (Lo-Coco, Cimino et al. 2004). Eine aktuelle Studie untersucht die Kombination von all-trans-Retinsäure (ATRA) und Arsentrioxid (ATO) gemeinsam mit GO in der Erstlinientherapie der APL (NCT01409161). In der Literatur werden APL Zellen also überwiegend positiv für CD33 beschrieben (Takeshita 2013). Bei der vorliegenden Auswertung war die Berechnung der MFI-Ratio durch eine hohe Autofluoreszenz der Isotypkontrolle geprägt und daher ein Vergleich mit anderen Subtypen nicht möglich. Nichts desto trotz galt, einer MFI-Ratio über 1,5 vorausgesetzt, die Expression fast aller untersuchten Blasten als positiv für CD33. Durch die Behandlungsmöglichkeiten mit ATRA und ATO ist die Prognose der APL innerhalb der AML Subgruppen als ausgesprochen günstig zu sehen, im Rezidiv oder bei therapierefraktären Patienten könnte der Beitrag eines weiteren, effektiven Therapeutikum gleichwohl einen wichtigen Stellenwert einnehmen (Lo-Coco, Cimino et al. 2004, Takeshita, Shinjo et al. 2005).

## **2. Erfahrungen mit CD33 Antikörpern und Vorteile von AMG 330**

Klinische Erfahrungen mit einem Anti CD33 Antikörper liegen für den humanisierten IgG2 Antikörper Lintuzumab vor. Der Antikörper vermittelt seine zytotoxische Wirkung mittels ADCC (Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität, Antibody dependent cellular cytotoxicity), überwiegend über den CD16 Rezeptor auf Effektorzellen (Caron, Co et al. 1992). Dieser Mechanismus stellt eine Verbindung zwischen angeborenen und adaptiven Immunsystem dar und für Antikörper mit ADCC Aktivität wie Rituximab existieren viele erfolgreiche, klinische Ergebnisse (Wang, Erbe et al. 2015). Für Lintuzumab konnte allerdings nie ein klarer klinischer Nutzen gezeigt werden. In einer randomisierten Studie mit 211 älteren Patienten, die 2013 veröffentlicht wurde, brachte zusätzliches Lintuzumab zur Induktionstherapie zwar ein befriedigendes Sicherheitsprofil, allerdings selbst in der Subgruppenanalyse keinen nachweisbaren Nutzen (Feldman, Brandwein et al. 2005, Sekeres, Lancet et al. 2013). Als ein möglicher Grund scheint die eingeschränkte NK-Zell Funktion bei AML Patienten zu einer niedrigen ADCC Aktivität zu führen (Sekeres, Lancet et al. 2013).

Für den Antikörper GO liegen ambivalente klinische Beobachtungen vor. Unbefriedigende Therapieergebnisse bei einer erhöhten Rate an unerwünschten Nebenwirkungen führten zur Marktrücknahme von GO im Jahr 2010. Neben der Kritik über Therapieprotokolle und Differenzierung des Patientenkollektivs könnten allerdings auch Eigenschaften in Pharmakodynamik und Pharmakokinetik Gründe für die limitierte Effektivität des Antikörpers seien. Die Wirksamkeit des Antikörperkonstrukts ist abhängig von der Rate seiner Internalisierung, welche wiederum positiv mit der CD33 Expression auf der Oberfläche der Zellen korreliert (Walter, Raden et al. 2008). Verschiedene Versuche, das Schleusen des Toxin Calicheamicin aus der Zelle durch Transportersysteme wie P-Glykoprotein und MRP1 zu verhindern, blieben meist erfolglos (Laszlo, Estey et al. 2014). Eine gefürchtete unerwünschte Nebenwirkung ist neben der Myelosuppression die toxische Wirkung von GO auf Hepatozyten, die bis zum Leberversagen führen kann (Rajvanshi, Shulman et al. 2002). In einer Studie mit älteren Patienten zwischen 60 und 75 Jahren, in der einer der beiden Patientengruppen zusätzlich zu der üblichen Induktions- und



**Abbildung 37: Die Reaktion der AML Blasten auf GO könnte von der Bindung, Internalisierung von GO-CD33-Komplexen, Re-Expression von CD33 und der P-gp-vermittelten Ausschleusung des Toxin abhängen. Abbildung aus (Pagano, Fianchi et al. 2007).**

Konsolidierungstherapie GO bekam, zeigte sich kein Überlebensvorteil aber eine erhöhte Toxizität von GO (Amadori, Suciu et al. 2013). Wohl aufgrund der Internalisierung des Moleküls, konnte sowohl eine bessere Ansprechrate als auch eine niedrigere Akkumulation und weniger Toxizität bei der häufigeren Applikation kleiner Gaben im Vergleich zu seltener frequentierten und höher dosierten Gaben beobachtet werden (Farhat, Reman et al. 2012). Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, existieren Ergebnisse aus klinischen Studien, die einen effektiven Nutzen von GO belegen konnten und Studien, die zu einer Marktrücknahme im Jahr 2010 führten, werden seitdem kontrovers diskutiert. Ein möglicher Effekt der Therapie könnte so durch suboptimale Dosierungsschema und ein Auslassen einer Subgruppenanalyse verursacht sein (Lichtenegger, Krupka et al. 2015). Zusammengefasst zeigte eine Metaanalyse 2014 eine Reduktion des Rezidiv-Risikos und einen klaren Vorteil im Überleben für Patienten, die keine Hochrisikozytogenetik aufwiesen, sodass gegenwärtig mit einer erneuten Zulassung von GO gerechnet wird (Hills, Castaigne et al. 2014)

Im Gegensatz zu GO ist AMG 330 nicht auf die teilweise langsame Internalisierung des Rezeptors angewiesen und niedrige Expressionen auf den Oberflächen verlangsamen nur die Kinetik der T-Zell vermittelten Zelllyse des Antikörpers (Walter, Raden et al. 2008, Krupka, Kufer et al. 2014). Eine Wirksamkeit besteht auch bei monovalenter Bindung an CD 33, während bei GO



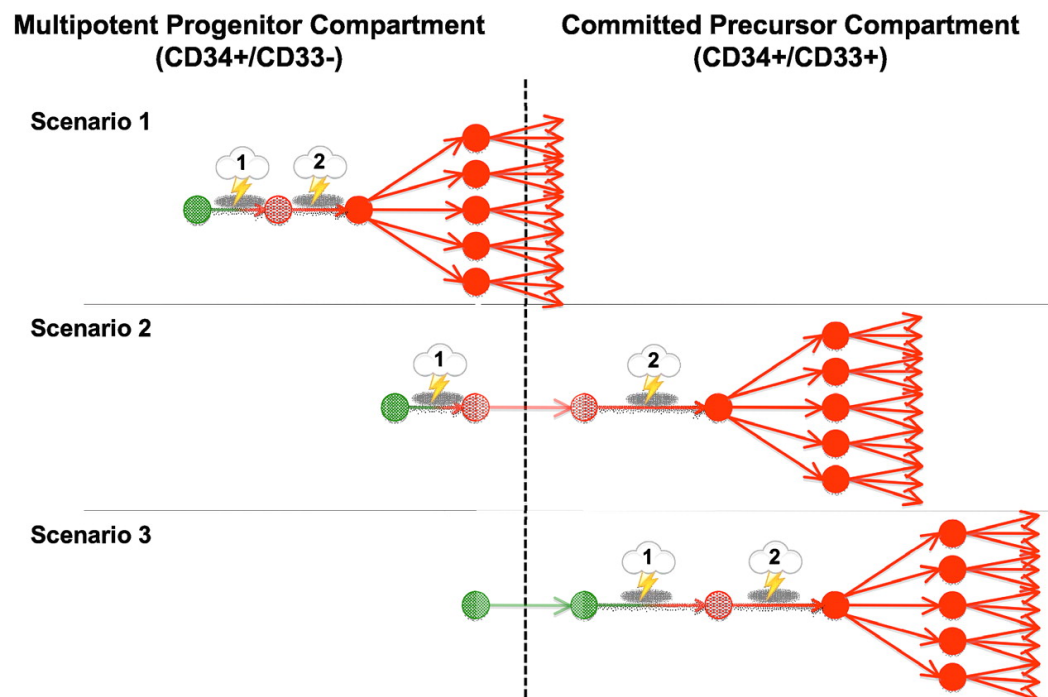
die bivalente Bindung Voraussetzung für die Internalisierung und das Einschleusen des Toxins ist. AMG 330 ist ferner nicht von der Ausschleusung eines konjugierten Toxins abhängig und moduliert bei einer kontinuierlichen Gabe aufgrund der monovalenten Bindung nicht die Expression von CD33 (Laszlo, Gudgeon et al. 2014). So könnten auch Patienten der ungünstigen Risikogruppe von einer Therapie profitieren, speziell dann, wenn der Antikörper, vergleichbar wie Blinatumomab, kontinuierlich über eine Dauerinfusion appliziert wird. In einer vierwöchigen Langzeitkultur zeigte AMG 330 hohe zytotoxische Effekte auch bei niedrigen E:T Ratio (Krupka, Kufer et al. 2014).

### **3. CD33 Expression auf Leukämie initiiierenden Zellen**

Die Fähigkeit, AML Zellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften zu eliminieren bleibt die große Herausforderung, um ein Rezidiv bei AML Patienten zu vermeiden. Klonalitäts-Untersuchungen von AML Zellen legen die Existenz von verschiedenen Ursprüngen im Reifegrad der Zellen nahe und nur eine kleine Anzahl aller AML Zellen ist in der Lage, unter *in vitro* Bedingungen zu proliferieren (Sabbath, Ball et al. 1985, Griffin and Lowenberg 1986). Dabei könnten die Leukämien aus einer gemeinsamen, CD33 negativen multipotenten Stammzelle entstanden sein, oder auch aus einer überwiegend myeloischen, CD33 positiven Vorläuferzelle. Eine CD33 gerichtete Immuntherapie könnte so maligne Stammzellen eliminieren und dabei normale hämatopoetische Zellen verschonen, in anderen Fällen wären die Leukämien gegenüber CD33 Immuntherapien resistent (Walter, Appelbaum et al. 2012). Als wichtiges Argument für die Expression von CD33 auf leukämie-initiiierenden Zellen diene bisher der Nachweis des Antigens auf den Zellen, die im SCID Mausmodell anwuchsen, im Gegensatz zu CD33 negativen Zellen, bei denen dies nicht möglich war (Taussig, Pearce et al. 2005).

Die CD34+/CD38- Zellen von primären AML Proben wurden im humanisierten Mausmodell als die Zellen mit einem exklusiven langfristigen Anwachsen (Engraftment) identifiziert. Demnach wurde Zellen in diesem Kompartiment die besondere Fähigkeiten von Stammzellen, also der Selbsterhaltung und somatischen Selbsterneuerung, zugetraut (Terstappen, Huang et al. 1991, Dick 2008). Wir fanden eine höhere CD33 Expression im Kompartiment der CD34+/CD38- Zellen als auf gesunden hämatopoetischen Stammzellen, suggestiv

für einen höheren Effekt von CD33 gerichteten Therapien gegen LIC im Vergleich zu gesunden Stammzellen (Krupka, Kufer et al. 2014). Die CD33 Expression auf der Gesamtheit aller AML Zellen war bei fast allen Patienten positiv für CD33, während die MFI-Ratio der jeweiligen LIC in unserer Auswertung und im Vergleich meist niedrigere MFI-Ratio zeigte (Krupka, Kufer et al. 2014). Einen suffizienten Effekt trotz niedriger Expressionsintensität konnte von Krupka et al. gezeigt werden, indem Zellen von zwei AML Patienten mit AMG 330, Kontrollantikörper und Effektorzellen inkubiert und anschließend T-Zell depletiert in NSG Mäuse injiziert wurden. Während die Mäuse mit AMG 330 über 100 Tage überlebten, verstarben alle Mäuse der Kontrollgruppe an ihrer Leukämie (Krupka, Kufer et al. 2016). Dies zeigt das besondere Potential von AMG 330, auch leukämische Stammzellen zu eliminieren.



**Abbildung 38: Vereinfachtes hypothetisches Modell der stufenweisen Transformation von Stamm- und Vorläuferzellen von normalen (grün) bis eventuell (gelb) und malignen Zellen (rot). Im ersten Szenario finden die Transformationen im Stadium der CD33 negativen, multipotenten Vorläuferzelle statt. Im Szenario 3 dann sowohl initiale wie auch spätere Mutationen im Stadium der CD33 positiven gemeinsamen myeloischen Vorläuferzelle. Abbildung aus (Walter, Appelbaum et al. 2012).**

Vergleichsweise niedrige Expressionen auf LIC könnten, nach einer Hypothese von Walter et al, an dem Ursprung der jeweiligen Leukämie aus einer sehr frühen Vorläuferzelle liegen. Der BiTE® AMG 330 scheint aber auch bei niedriger

Präsenz des Antigens in der Lage zu einer Zelllyse der LIC (Krupka, Kufer et al. 2014, Harrington, Gudgeon et al. 2015, Krupka, Kufer et al. 2016).

#### **4. Toxizität auf gesunde hämatopoetische Zellen**

CD34+/CD38- HSC von gesunden Spendern zeigten in der vorliegenden Analyse eine signifikant niedrigere CD33 Expressionen als CD34+/CD38- LIC von AML Patienten (Krupka, Kufer et al. 2014). Dies ist wichtig, um eine unerwünschte Toxizität des Antikörpers auf nicht-AML Zellen in einem tolerablen Ausmaß zu gewährleisten. In teilweise sehr hohen Konzentrationen (5µg/ml) von AMG 330 mit allogenen T-Zellen von gesunden Spendern zeigte sich kein Hinweis auf eine Toxizität der CD34+ und Linienmarker negativen Zellen in den CFU Versuchen. Während im Mausmodell von Taussig et al. vor allem CD33 positive LIC Stammzeleigenschaften hatten und nur sie zu Wachstum im SCID Mausmodell in der Lage waren, zeigten dagegen CD33+ und CD33- HSC in den Mäusen ein Wachstum (Taussig, Pearce et al. 2005). Im bestmöglichen Fall eliminiert AMG 330 also die LIC und spart die CD33 negativen HSC aus. Letztere ermöglichen dann eine Regeneration des Knochenmarks. Diese Ergebnisse bestätigen zudem die Resultate einer Arbeitsgruppe, die ein CD3-CD33 Antikörperkonstrukt mit dem gleichen Zielantigen für die AML Therapie entwickelt hat (Arndt, von Bonin et al. 2013). Auch hier wurde keine Einschränkung der kolonieformenden Einheiten nach 20 stündiger Vorinkubation von Antikörper, CD34 positiven Stammzellen und T- Zellen eines gesunden Spenders beobachtet (Arndt, von Bonin et al. 2013). Die beschriebene Aktivierung der Spenderlymphozyten durch Hochregulierung von CD25 und CD69 hatte scheinbar keinen Einfluss auf die Toxizität gegen HSC. Ferner wurde in NOD/SCID IL2Ry<sup>-/-</sup> Mäusen, die mit vorinkubierten HSC injiziert wurden, nach 20 Wochen mit oder ohne Antikörper kein Unterschied des Spenderchimärismus im peripheren Blut und Knochenmark gefunden. Es konnte also von einem regelhaften Anwachsen der HSC in den Mäusen und damit ausbleibender Toxizität auf gesunde HSC auch durch dieses CD3-CD33 Antikörperkonstrukt ausgegangen werden (Arndt, von Bonin et al. 2013).

## **5. Bevorzugte Zytotoxizität von Zellen mit hoher CD33 Expression**

Für die Mixkultur konnten mit MV4-11 und OCI-AML3 zwei Zelllinien ausgewählt werden, die sich deutlich in ihrer CD33 Expression unterschieden. In einer im Jahr 2014 veröffentlichten Studie wurden elf AML Zelllinien mit ansteigender Konzentration von AMG 330 inkubiert und bei gleicher Anzahl von T-Zellen die  $EC_{50}$  ermittelt (Friedrich, Henn et al. 2014). Wenn von den Autoren auch nicht beschrieben, so fällt doch auch dort eine Tendenz zu niedrigen  $EC_{50}$  bei den Zellreihen mit hoher CD33 Expression auf (Friedrich, Henn et al. 2014). In einer weiteren Studie aus dem gleichen Jahr von Laszlo et al. zeigte sich die Aktivität von AMG 330 abhängig von Dosis und E:T Ratio. Die  $EC_{50}$  von AMG 330 scheint auch hier im Zusammenhang mit der Expression von CD33 zu sein (Laszlo, Gudgeon et al. 2014). Wie in unserer Auswertung, wurde auch in der Studie von Laszlo et al. untersucht, ob die Expression des CD33 Antigen einen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von AMG 330 nimmt (Krupka, Kufer et al. 2014). Dazu wurden Zellen der OCI-AML3 und KG-1a Linie mit Wildtyp CD 33 transduziert und so unterschiedliche Expressionslevel erzeugt. Dabei zeigte sich eine quantitative Abhängigkeit von Expression und Zytotoxizität über 48 Stunden (Laszlo, Gudgeon et al. 2014). Laszlo verwendete dafür E:T zwischen 1:5 und 10:1 und wählte so E:T Ratios mit deutlich größeren Unterschieden wie in unserem Versuch der Mixkultur (Krupka, Kufer et al. 2014). Insgesamt konnten wir zeigen, dass die antikörpervermittelte Zytotoxizität unter dem Einfluss des Expressionslevels vor allem auf die Dynamik der Zelllyse einen Einfluss nimmt (Krupka, Kufer et al. 2014). Wichtig ist dabei allerdings, dass durch eine Verlängerung der Kulturzeit mit AMG330 auf 12-15 Tage eine effektive Zelllyse auch von AML Zellen mit niedriger Antigenexpression gezeigt werden konnte (Krupka, Kufer et al. 2016), hinweisend für eine mögliche Kompensation von langsamer Zytotoxizität durch die prolongierte Exposition des Antikörpers.

## **6. Chancen und Herausforderungen von und mit AMG 330**

### **6.1. Ungewünschte Toxizität**

Die Dauer der Therapie mit AMG 330 wird von unmittelbarer klinischer Bedeutung sein, da die tolerierbare Exposition in vivo von der Toxizität auf normale hämatopoetische Zellen abhängen wird. CD33 ist unter anderem auf

neutrophilen Granulozyten exprimiert und somit sind Neutropenien als eine der wichtigsten Nebenwirkungen zu erwarten. Eine Verlängerung der Zeit in hämatologischer Aplasie, also mit einem absoluten Mangel an neutrophilen Granulozyten ist mit schweren Infektionen assoziiert, die im ungünstigsten aber nicht seltenem Fall letale Folgen haben können (Levine and Deisseroth 1978). So erscheint es auch nicht erstaunlich, dass in den GO Studien längere Neutropenien in dem Arm mit GO beobachtet wurden (Castaigne, Pautas et al. 2012). Auch die, bei GO beobachtete Lebertoxizität könnte mit einer unerwünschten, gegen CD33 tragende Kupfferzellen oder CD33 positive Hepatozyten in den Lebersinusoiden zusammenhängen und hätte damit auch für weitere CD33 Antikörperkonstrukte eine wichtige Relevanz (Maniecki, Hasle et al. 2011). In der aktuell geplanten Phase 1 Studie (NCT02520427) mit AMG 330 wird daher auch eine mit zwei Wochen deutlich kürzere Exposition des CD33 BiTE® geplant, als dies in der klinischen Anwendung für das „Schwestermolekül“ Blinatumomab üblich ist. Um einen signifikanten therapeutischen Effekt erzielen zu können, wird aber, neben der Reduktion auf AML Bulk, Zellen, insbesondere ein zytotoxischer Effekt auf LIC ausschlaggebend sein. Die unterschiedliche CD 33 Expression in den verschiedenen Zellkompartimenten wird daher höchstwahrscheinlich die maximal vertretbare *in vitro* Zeit der Antikörperexposition bestimmen und damit eine entscheidende Bedeutung in Sicherheit, Anwendbarkeit und Effektivität von AMG 330 in AML Patienten haben.

## **6.2. Bekannte Nebenwirkungen von Blinatumomab**

Neben häufigen unerwünschten Wirkungen des CD19-CD3 BiTE® Blinatumomab wie Fieber, Kopfschmerzen und Erschöpfung (Walter 2014), sind die wichtigen neurologischen Nebenwirkungen, Enzephalopathie oder Kopfschmerz vermutlich über eine direkte Wirkung auf das CD19 Antigen vermittelt. Diese traten besonders bei älteren Patienten auf und sind der häufigste Grund für einen vorzeitigen Therapieabbruch (Przepiorka, Ko et al. 2015). Eine weitere wichtige und dosisabhängige Nebenwirkung ist das systemisch inflammatorische Responsesyndrom, ein durch einen „Zytokinsturm“ ausgelöster Zustand, bei dem es durch eine schnelle Zerstörung von einer größeren Anzahl Tumorzellen zur Freisetzung vieler Entzündungsmediatoren der beteiligten T Zellen kommt. Symptome reichen dabei von hohem Fieber, Kopfschmerzen und generellen Schmerzen bis hin zu einem Multiorganversagen. Sollte die hohe

Oberflächenpräsentation des CD33 Antigens zur schnellen zytotoxischen Kinetik von AMG 330 führen, dann wäre bei hohen Expressionen auch für AMG 330 ein „Zytokinsturm“ möglich. Für diese Fälle müsste eine risikoadaptierte Dosierung gewählt werden, eventuell müsste vorher auch die Tumorlast reduziert werden. Faktoren, die einen Einfluss auf die Kinetik der Zelllyse nehmen, sind daher wichtige Einflussgrößen bei der Erstellung von Therapieprotokollen für die AML Therapie mit AMG 330. Denkbar wäre so eine Applikation des Antikörpers je nach individueller CD33 Expression, mit Modifikationen in Intervallen und Dosierung. Für einige Patienten wäre auch eine sogenannte „Vorphase“ mit konventionellen Zytostatika eine vorstellbare Strategie, um vor der eigentlichen Therapie mit AMG 330 das E:T Ratio zu erhöhen (Krupka, Kufer et al. 2014).

### **6.3. Immunschwächende Mechanismen**

Es scheint die vermehrte Zirkulation von proentzündlichen Zytokinen durch AMG 330 vermittelt zu werden, welche gleichzeitig zur Aktivierung von immunschwächenden Mechanismen führt, welche wiederum die Wirkung des bispezifischen Antikörpers abschwächen (Krupka, Kufer et al. 2016). Ergebnisse, die einen Erfolg bei der Blockade der immunschwächenden PD/PD-L1 (Programmed cell death protein /Programmed cell death protein -ligand 1) Interaktion zeigten, waren besonders dann erfolgreich, wenn die antikörpervermittelte Kinetik langsam stattfand (Krupka, Kufer et al. 2016). So könnte eine Blockade bei Patienten mit niedrigen Expressionsleveln oder niedrigen E:T Zellratios einen erfolgreichen Einsatz von AMG 330 auch bei diesem Patientenkollektiv ermöglichen.

### **6.4. Therapie und Anwendung**

Bei der Interpretation der Mixkultur konnten eine wichtige Hypothesen erstellt werden: Die zytotoxische Dynamik des Antikörpers AMG 330 ist abhängig von der Expressionsdichte von CD33 auf der Oberfläche von AML Zellen. Betrachtet man die ELN Klassifikation gemeinsam mit der Expressionsauswertung, so könnten demnach insbesondere Patienten der günstigen und intermediären Risikogruppe von einer Therapie profitieren, wie es auch für GO gezeigt werden konnte (Burnett, Hills et al. 2011, Hills, Castaigne et al. 2014). Allerdings berücksichtigt die Einteilung in drei Gruppen nicht die Biologie der jeweiligen AML und so sind innerhalb einer Gruppe sowohl AML Subtypen, für die wir eine

hohe CD 33 Expression zeigen konnten, wie auch Subgruppen mit niedrigen Expressionsmuster subsummiert. Ferner zeigen Ergebnisse, die ein Ansprechen von GO, zum Beispiel auch bei Personen mit CBF Leukämien zeigten, dass die Wirkung der CD 33 basierten Therapie nicht nur von der Expression des Zielantigens abhängt, sondern wahrscheinlich auch von der biologischen Signifikanz der jeweiligen Mutationen in den AML Zellen (Borthakur, Cortes et al. 2014). Für Therapien mit rekrutierenden T-Zellen werden zudem die jeweils vorliegenden E:T Ratio und die individuellen Bedingungen zur T Zellaktivierung von wichtiger Bedeutung sein. In der Mixkultur geschah die Eliminierung der OCI-AML3 Zellen mit niedriger Expression zwar in einer langsameren Kinetik, sie fand aber gleichwohl in allen E:T Ratio statt (Krupka, Kufer et al. 2014). Diese Ergebnisse mit AMG 330 zeigen, dass die CD 33 Expression also primär einen Einfluss auf die Dynamik der zytotoxischen Wirkung nimmt und die Therapie grundsätzlich für alle Patienten attraktiv bleibt. Die klinischen *in vitro* Untersuchungen der Zukunft werden zeigen, welche Dynamik der Zelllyse im Körper nötig ist, um Toxizität und Effektivität in einer vertretbaren Balance zu gewährleisten.

## 7. Ausblick

Die Entwicklungen von verschiedenen Antikörperkonstrukten verdeutlichen das weiterhin große Interesse, mit CD33 als Zielstruktur, neue Immuntherapien für AML Patienten zu entwickeln. Sie unterstreichen damit die Notwendigkeit, Funktion und Expression des Antigens noch besser zu verstehen. Das Verhalten von CD33 auf der Oberfläche der AML Zelle während der Therapie wird für den Erfolg ausschlaggebend sein. Die Verhältnisse von Genregulierung, Erkrankung, Therapie und Mikroumgebung sollten für genaueres Verständnis der Therapieeffekte noch besser untersucht werden und könnten bei der Patientenauswahl hoch relevant für die initiierten prospektiven Studien sein.

Neuste Erkenntnisse in Diagnostik und Risikoeinteilung der AML müssen im klinischen Alltag ihre Validität beweisen und in Zusammenhang mit der Dichte von Oberflächenantigenen gebracht werden. Die Zusammenhänge zwischen Expressionslevel und Subtypen konnten mit niedriger Fallzahl bereits bestätigt werden (Ehninger, Kramer et al. 2014). Zusätzlich werden neue Antigene erforscht werden, die auch in Kombination mit CD33 eingesetzt werden, um die

Spezifität zu erhöhen und gleichzeitig das Nebenwirkungsprofil zu optimieren. Bei der heterogenen Biologie der Erkrankung AML erscheint es verständlich, dass die Oberflächenantigene in den verschiedenen Subgruppen unterschiedlich hoch exprimiert werden. Vorstellbar wäre es, in Zukunft einen individuellen Therapieplan nach einem persönlichen AML Profil mit dem Wissen der geeignetsten (Immun-)Therapie zu erstellen.

Die Möglichkeiten eines Monitorings mittels MRD Diagnostik ermöglicht die Identifikation von Resterkrankung bereits zu einem frühen Zeitpunkt und könnte den Effekt neuer Therapien vor Auftreten eines morphologischen Rezidiv schon früher vorhersagen, als es noch vor einigen Jahren möglich war. Risikostrategien und MRD Monitoring werden in der Zukunft wohl einen konkurrierenden Beitrag bei den Indikationsstellungen vor Einleitung einer weiteren Therapie stellen.

Es sollten besonders bei Patienten ohne Aktivierung von T Zellen wichtige Immunescape-Mechanismen genauer untersucht werden. Während der Therapie mit AMG 330 kommt daher dem Monitoring der Effektorzellen eine wichtige Bedeutung zu. Denkbar wäre für Patienten mit einem T Zellversagen zudem auch eine supportive Therapie mit PD1 Antagonisten oder weiteren sogenannten Checkpoint-Inhibitoren (Krupka, Kufer et al. 2016).

Der bispezifische Antikörper AMG 330 scheint gegenüber GO und Lintuzumab Vorteile in seinem Wirkmechanismus zu besitzen und ist eine hoffnungsvolle Alternativtherapie, auch für Patienten die nicht für eine intensive Chemotherapie in Frage kommen.

Um ein Langzeitüberleben der Patienten zu gewährleisten, muss AMG 330 neben einer effektiven Eliminierung aller AML Zellen, speziell auch zu einer Eliminierung von LIC führen, da ihre Persistenz höchstwahrscheinlich verantwortlich für Rezidiv und damit Therapieversagen ist.

Insgesamt stimmen die vielversprechenden präklinischen Ergebnisse des Antikörpers optimistisch, ein effektives neues Therapeutikum für AML Patienten gefunden zu haben. Eine Phase 1 Studie wurde im November 2015 für Patienten mit einer therapierefraktären oder rezidierten AML initiiert (NCT02520427). Die Ergebnisse werden zeigen, ob sich unsere und andere bisherigen Ergebnisse unter den besonderen *in vivo* Bedingungen bestätigen lassen.



## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die akute myeloische Leukämie besitzt weiterhin eine schlechte Prognose. Obgleich die initiale Chemotherapie in den überwiegenden Fällen eine komplette Remission induziert, so rezidivieren doch die meisten Patienten innerhalb der ersten Jahre nach Diagnosestellung. Antikörperbasierte Therapien sind eine vielversprechende Strategie, um chemoresistente leukämische Zellen zu eliminieren und damit das hohe Rezidivrisiko auf ein Minimum zu reduzieren. Das verbreitetste Antigen für die Immuntherapie der AML ist bisher CD33.

Eine Analyse der CD33 Expression leukämischer Blasten von 703 neu diagnostizierten AML Patienten wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht und anhand der MFI-Ratio in drei Terzile aufgeteilt. Über 99 % der Patienten galten insgesamt als positiv für CD33. Interessanterweise korrelierte eine hohe CD33 Expression mit einer Mutation des *NPM1* Gens und den Subgruppen Gruppen M4 und M5 der FAB Klassifikation. Eine niedrige Expression von CD33 war mit einem komplexen Karyotyp assoziiert (Krupka, Kufer et al. 2014).

Leukämische Stammzellen sind überwiegend im Kompartiment der CD34+/CD38- Zellen zu finden und werden als ursächlich für Rezidiv und Resistenz gegen Zytostatika gesehen. In dieser Arbeit wurde die MFI-Ratio auf LIC niedriger als auf anderen leukämischen Zellen gemessen, aber höher als auf CD34+/CD38- Zellen von gesunden Knochenmarksspendern. In teilweise sehr hohen Konzentrationen wurde keine Toxizität von AMG 330, einem bispezifischen CD3-CD33 Antikörper auf Linienmarker negativen Zellen, beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass vor allem AML Zellen und LIC durch AMG 330 eliminiert werden und eine sichere klinische Anwendung möglich ist (Krupka, Kufer et al. 2014).

Es konnte ein geeignetes E:T Ratio zur Fragestellung der präferentiellen T-Zell vermittelten Zelllyse in Abhängigkeit der CD33 Expression erfolgreich in einem viertägigen Kokultursystem ermittelt werden. In einer Mixkultur mit der hoch CD33 exprimierenden Zelllinie MV4-11 und der niedrig exprimierenden Zelllinie OCI-AML3 wurde bei Zugabe von AMG 330 bereits nach 24 Stunden in allen E:T Ratios eine schnellere Zelllyse der hoch exprimierenden MV4-11 Zelllinie beobachtet. Jedoch wurden bei einer Verlängerung der Kulturdauer beide

Zelllinien gleichermaßen eliminiert (Krupka, Kufer et al. 2014). Dies suggeriert einen Effekt auch auf niedrig exprimierende AML Zellen bei längerer Exposition mit AMG 330. Die schnellere Zelllyse von hoch exprimierenden Zellen im Zellmodell unterstützt die Hypothese, dass einige Subgruppen von einer schnellen Kinetik des bispezifischen Antikörpers profitieren könnten, während andere Patienten eine längere Therapie benötigen. Da CD33 ubiquitär auf myeloischen Zellen wie Granulozyten exprimiert wird, wird aber eine zeitliche Begrenzung für die Anwendung des bispezifischen Antikörpers bestehen.

Klinische Studien, wie die Phase 1 Studie NCT02520427 werden zeigen, ob sich die *in vitro* Untersuchungen mit dem bispezifischen Antikörper auch unter den vielen Einflussgrößen einer *in vivo* Exposition bestätigen lassen.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Aigner, M., J. Feulner, S. Schaffer, R. Kischel, P. Kufer, K. Schneider, A. Henn, B. Rattel, M. Friedrich, P. A. Baeuerle, A. Mackensen and S. W. Krause (2013). "T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE antibody construct." Leukemia **27**(5): 1107-1115.

Alpermann, T., W. Kern, S. Schnittger, C. Schmid, K. A. Kreuzer, H. Serve, H. J. Pielken, N. Schmitz, C. M. Wendtner, C. Haferlach and T. Haferlach (2013). "Evaluation of the proposed reporting system of the European LeukemiaNet and recommendations for prognosis of acute myeloid leukemia." Leuk Res **37**(2): 197-200.

Amadori, S., S. Suci, R. Stasi, H. R. Salih, D. Selleslag, P. Muus, P. De Fabritiis, A. Venditti, A. D. Ho, M. Lubbert, X. Thomas, R. Latagliata, C. J. Halkes, F. Falzetti, D. Magro, J. E. Guimaraes, Z. Berneman, G. Specchia, M. Karrasch, P. Fazi, M. Vignetti, R. Willemze, T. de Witte and J. P. Marie (2013). "Sequential Combination of Gemtuzumab Ozogamicin and Standard Chemotherapy in Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: Results of a Randomized Phase III Trial by the EORTC and GIMEMA Consortium (AML-17)." J Clin Oncol.

Andrews, R. G., B. Torok-Storb and I. D. Bernstein (1983). "Myeloid-associated differentiation antigens on stem cells and their progeny identified by monoclonal antibodies." Blood **62**(1): 124-132.

Appelbaum, F. R. (2015). "Hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia with minimal residual disease." Best Pract Res Clin Haematol **28**(2-3): 133-140.

Appelbaum, F. R., H. Gundacker, D. R. Head, M. L. Slovak, C. L. Willman, J. E. Godwin, J. E. Anderson and S. H. Petersdorf (2006). "Age and acute myeloid leukemia." Blood **107**(9): 3481-3485.

Arndt, C., M. von Bonin, M. Cartellieri, A. Feldmann, S. Koristka, I. Michalk, S. Stamova, M. Bornhauser, M. Schmitz, G. Ehninger and M. Bachmann (2013). "Redirection of T cells with a first fully humanized bispecific CD33-CD3 antibody efficiently eliminates AML blasts without harming hematopoietic stem cells." Leukemia **27**(4): 964-967.

Baeuerle, P. A. and C. Reinhardt (2009). "Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy." Cancer Res **69**(12): 4941-4944.

Bene, M. C., G. Castoldi, W. Knapp, W. D. Ludwig, E. Matutes, A. Orfao and M. B. van't Veer (1995). "Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)." Leukemia **9**(10): 1783-1786.

Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick and C. Sultan (1976). "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group." Br J Haematol **33**(4): 451-458.

Bochner, B. S. and N. Zimmermann (2015). "Role of siglecs and related glycan-binding proteins in immune responses and immunoregulation." J Allergy Clin Immunol **135**(3): 598-608.

Borthakur, G., J. E. Cortes, E. E. Estey, E. Jabbour, S. Faderl, S. O'Brien, G. Garcia-Manero, T. M. Kadia, X. Wang, K. Patel, R. Luthra, C. Koller, M. Brandt, F. Ravandi and H. Kantarjian (2014). "Gemtuzumab ozogamicin with fludarabine, cytarabine, and granulocyte colony stimulating factor (FLAG-GO) as front-line regimen in patients with core binding factor acute myelogenous leukemia." Am J Hematol.

Bross, P. F., J. Beitz, G. Chen, X. H. Chen, E. Duffy, L. Kieffer, S. Roy, R. Sridhara, A. Rahman, G. Williams and R. Pazdur (2001). "Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia." Clin Cancer Res **7**(6): 1490-1496.

Burke, M. J. (2016). "Minimal Residual Disease in NPM1-Mutated AML." N Engl J Med **374**(5): 481-482.

Burnett, A. K., R. K. Hills, D. Milligan, L. Kjeldsen, J. Kell, N. H. Russell, J. A. Yin, A. Hunter, A. H. Goldstone and K. Wheatley (2011). "Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial." J Clin Oncol **29**(4): 369-377.

Burnett, A. K., N. H. Russell, R. K. Hills, J. Kell, S. Freeman, L. Kjeldsen, A. E. Hunter, J. Yin, C. F. Craddock, I. H. Dufva, K. Wheatley and D. Milligan (2012). "Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy improves survival in older patients with acute myeloid leukemia." J Clin Oncol **30**(32): 3924-3931.

Caron, P. C., M. S. Co, M. K. Bull, N. M. Avdalovic, C. Queen and D. A. Scheinberg (1992). "Biological and immunological features of humanized M195 (anti-CD33) monoclonal antibodies." Cancer Res **52**(24): 6761-6767.

Castaigne, S., C. Pautas, C. Terre, E. Raffoux, D. Bordessoule, J. N. Bastie, O. Legrand, X. Thomas, P. Turlure, O. Reman, T. de Revel, L. Gastaud, N. de Gunzburg, N. Contentin, E. Henry, J. P. Marolleau, A. Aljijakli, P. Rousselot, P. Fenaux, C. Preudhomme, S. Chevret, H. Dombret and A. Acute Leukemia French (2012). "Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study." Lancet **379**(9825): 1508-1516.

Chang, Y. C. and V. Nizet (2014). "The interplay between Siglecs and sialylated pathogens." Glycobiology **24**(9): 818-825.

Cowan, A. J., G. S. Laszlo, E. H. Estey and R. B. Walter (2013). "Antibody-based therapy of acute myeloid leukemia with gemtuzumab ozogamicin." Front Biosci (Landmark Ed) **18**: 1311-1334.

Crocker, P. R., J. C. Paulson and A. Varki (2007). "Siglecs and their roles in the immune system." Nat Rev Immunol **7**(4): 255-266.

D. Rüttinger, G. Z., D. Nagorsen, C. Reinhardt, P. A. Baeuerle, Micromet AG, München. (2008). "BiTE®-Antikörper: Durch Bispezifität T-Lymphozyten gegen Tumorzellen richten." Journal Onkologie Zeitschrift online - Ausgabe 04-08

De Propriis, M. S., S. Raponi, D. Diverio, M. L. Milani, G. Meloni, B. Falini, R. Foa and A. Guarini (2011). "High CD33 expression levels in acute myeloid leukemia cells carrying the nucleophosmin (NPM1) mutation." Haematologica **96**(10): 1548-1551.

Dick, J. E. (2008). "Stem cell concepts renew cancer research." Blood **112**(13): 4793-4807.

Dinndorf, P. A., R. G. Andrews, D. Benjamin, D. Ridgway, L. Wolff and I. D. Bernstein (1986). "Expression of normal myeloid-associated antigens by acute leukemia cells." Blood **67**(4): 1048-1053.

Dohner, H., E. H. Estey, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Buchner, A. K. Burnett, H. Dombret, P. Fenaux, D. Grimwade, R. A. Larson, F. Lo-Coco, T. Naoe, D. Niederwieser, G. J. Ossenkoppele, M. A. Sanz, J. Sierra, M. S. Tallman, B. Lowenberg, C. D. Bloomfield and L. European (2010). "Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet." Blood **115**(3): 453-474.

Dohner, H., D. J. Weisdorf and C. D. Bloomfield (2015). "Acute Myeloid Leukemia." N Engl J Med **373**(12): 1136-1152.

Eghtedar, A., G. Borthakur, F. Ravandi, E. Jabbour, J. Cortes, S. Pierce, H. Kantarjian and G. Garcia-Manero (2012). "Characteristics of translocation (16;16)(p13;q22) acute myeloid leukemia." Am J Hematol **87**(3): 317-318.

Ehninger, A., M. Kramer, C. Rolig, C. Thiede, M. Bornhauser, M. von Bonin, M. Wermke, A. Feldmann, M. Bachmann, G. Ehninger and U. Oelschlagel (2014). "Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia." Blood Cancer J **4**: e218.

Estey, E. and H. Dohner (2006). "Acute myeloid leukaemia." Lancet **368**(9550): 1894-1907.

Estey, E., P. Thall, M. Beran, H. Kantarjian, S. Pierce and M. Keating (1997). "Effect of diagnosis (refractory anemia with excess blasts, refractory anemia with excess blasts in transformation, or acute myeloid leukemia [AML]) on outcome of AML-type chemotherapy." Blood **90**(8): 2969-2977.

Falini, B., C. Mecucci, E. Tiacci, M. Alcalay, R. Rosati, L. Pasqualucci, R. La Starza, D. Diverio, E. Colombo, A. Santucci, B. Bigerna, R. Pacini, A. Pucciarini, A. Liso, M. Vignetti, P. Fazi, N. Meani, V. Pettrossi, G. Saglio, F. Mandelli, F. Lo-Coco, P. G. Pelicci, M. F. Martelli and G. A. L. W. Party (2005). "Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype." N Engl J Med **352**(3): 254-266.

Farhat, H., O. Reman, E. Raffoux, C. Berthon, C. Pautas, L. Kammoun, S. Chantepie, C. Gardin, P. Rousselot, S. Chevret, H. Dombret and S. Castaigne (2012). "Fractionated doses of gemtuzumab ozogamicin with escalated doses of daunorubicin and cytarabine as first acute myeloid leukemia salvage in patients aged 50-70-year old: a phase 1/2 study of the acute leukemia French association." Am J Hematol **87**(1): 62-65.

Feldman, E. J., J. Brandwein, R. Stone, M. Kalaycio, J. Moore, J. O'Connor, N. Wedel, G. J. Roboz, C. Miller, R. Chopra, J. C. Jurcic, R. Brown, W. C. Ehmann, P. Schulman, S. R. Frankel, D. De Angelo and D. Scheinberg (2005). "Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia." J Clin Oncol **23**(18): 4110-4116.

Friedrich, M., A. Henn, T. Raum, M. Bajtus, K. Matthes, L. Hendrich, J. Wahl, P. Hoffmann, R. Kischel, M. Kvesic, J. W. Slootstra, P. A. Baeuerle, P. Kufer and B. Rattel (2014). "Preclinical characterization of AMG 330, a CD3/CD33-bispecific T-cell-engaging antibody with potential for treatment of acute myelogenous leukemia." Mol Cancer Ther **13**(6): 1549-1557.

Giles, F. J., G. Borthakur, F. Ravandi, S. Faderl, S. Verstovsek, D. Thomas, W. Wierda, A. Ferrajoli, S. Kornblau, S. Pierce, M. Albitar, J. Cortes and H. Kantarjian (2007). "The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia." Br J Haematol **136**(4): 624-627.

Griffin, J. D. and B. Lowenberg (1986). "Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia." Blood **68**(6): 1185-1195.

Grimwade, D. (2001). "The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia." Best Pract Res Clin Haematol **14**(3): 497-529.

Grimwade, D. (2012). "The changing paradigm of prognostic factors in acute myeloid leukaemia." Best Pract Res Clin Haematol **25**(4): 419-425.

Grimwade, D., R. K. Hills, A. V. Moorman, H. Walker, S. Chatters, A. H. Goldstone, K. Wheatley, C. J. Harrison, A. K. Burnett and G. National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working (2010). "Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials." Blood **116**(3): 354-365.

Harrington, K. H., C. J. Gudgeon, G. S. Laszlo, K. J. Newhall, A. M. Sinclair, S. R. Frankel, R. Kischel, G. Chen and R. B. Walter (2015). "The Broad Anti-AML Activity of the CD33/CD3 BiTE Antibody Construct, AMG 330, Is Impacted by Disease Stage and Risk." PLoS One **10**(8): e0135945.



Hauswirth, A. W., S. Florian, D. Printz, K. Sotlar, M. T. Krauth, G. Fritsch, G. H. Schernthaner, V. Wacheck, E. Selzer, W. R. Sperr and P. Valent (2007). "Expression of the target receptor CD33 in CD34+/CD38-/CD123+ AML stem cells." Eur J Clin Invest **37**(1): 73-82.

Hills, R. K., S. Castaigne, F. R. Appelbaum, J. Delaunay, S. Petersdorf, M. Othus, E. H. Estey, H. Dombret, S. Chevret, N. Ifrah, J. Y. Cahn, C. Recher, L. Chilton, A. V. Moorman and A. K. Burnett (2014). "Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials." Lancet Oncol **15**(9): 986-996.

Hills, R. K., S. Castaigne, F. R. Appelbaum, J. Delaunay, S. Petersdorf, M. Othus, E. H. Estey, H. Dombret, S. Chevret, N. Ifrah, J. Y. Cahn, C. Recher, L. Chilton, A. V. Moorman and A. K. Burnett (2014). "Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials." Lancet Oncol.

Ivey, A., R. K. Hills, M. A. Simpson, J. V. Jovanovic, A. Gilkes, A. Grech, Y. Patel, N. Bhudia, H. Farah, J. Mason, K. Wall, S. Akiki, M. Griffiths, E. Solomon, F. McCaughan, D. C. Linch, R. E. Gale, P. Vyas, S. D. Freeman, N. Russell, A. K. Burnett, D. Grimwade and U. K. N. C. R. I. A. W. Group (2016). "Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML." N Engl J Med **374**(5): 422-433.

Jilani, I., E. Estey, Y. Huh, Y. Joe, T. Manshouri, M. Yared, F. Giles, H. Kantarjian, J. Cortes, D. Thomas, M. Keating, E. Freireich and M. Albitar (2002). "Differences in CD33 intensity between various myeloid neoplasms." Am J Clin Pathol **118**(4): 560-566.

Kanate, A. S., M. C. Pasquini, P. N. Hari and M. Hamadani (2014). "Allogeneic hematopoietic cell transplant for acute myeloid leukemia: Current state in 2013 and future directions." World J Stem Cells **6**(2): 69-81.

Kiyoi, H. and T. Naoe (2002). "FLT3 in human hematologic malignancies." Leuk Lymphoma **43**(8): 1541-1547.

Kohnke, T., D. Sauter, K. Ringel, E. Hoster, R. P. Laubender, M. Hubmann, S. K. Bohlander, P. M. Kakadia, S. Schneider, A. Dufour, M. C. Sauerland, W. E. Berdel, T. Buchner, B. Wormann, J. Braess, W. Hiddemann, K. Spiekermann and M. Subklewe (2015). "Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse." Leukemia **29**(2): 377-386.

Kozłowska, A., J. Mackiewicz and A. Mackiewicz (2013). "Therapeutic gene modified cell based cancer vaccines." Gene **525**(2): 200-207.

Krupka, C., P. Kufer, R. Kischel, G. Zugmaier, J. Bogeholz, T. Kohnke, F. S. Lichtenegger, S. Schneider, K. H. Metzeler, M. Fiegl, K. Spiekermann, P. A. Baeuerle, W. Hiddemann, G. Riethmuller and M. Subklewe (2014). "CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330." Blood **123**(3): 356-365.

Krupka, C., P. Kufer, R. Kischel, G. Zugmaier, F. S. Lichtenegger, T. Kohnke, B. Vick, I. Jeremias, K. H. Metzeler, T. Altmann, S. Schneider, M. Fiegl, K. Spiekermann, P. A. Bauerle, W. Hiddemann, G. Riethmuller and M. Subklewe (2016). "Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3 BiTE antibody construct AMG 330: reversing a T-cell-induced immune escape mechanism." Leukemia **30**(2): 484-491.

Lacombe, F., F. Durrieu, A. Briaïs, P. Dumain, F. Belloc, E. Bascans, J. Reiffers, M. R. Boisseau and P. Bernard (1997). "Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia." Leukemia **11**(11): 1878-1886.

Laszlo, G. S., E. H. Estey and R. B. Walter (2014). "The past and future of CD33 as therapeutic target in acute myeloid leukemia." Blood Rev **28**(4): 143-153.

Laszlo, G. S., C. J. Gudgeon, K. H. Harrington, J. Dell'Aringa, K. J. Newhall, G.

D. Means, A. M. Sinclair, R. Kischel, S. R. Frankel and R. B. Walter (2014). "Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML." Blood **123**(4): 554-561.

Levine, A. S. and A. B. Deisseroth (1978). "Recent developments in the supportive therapy of acute myelogenous leukemia." Cancer **42**(2 Suppl): 883-894.

Lichtenegger, F. S., C. Krupka, T. Kohnke and M. Subklewe (2015). "Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia." Semin Hematol **52**(3): 207-214.

Lichtenegger, F. S., F. M. Schnorfeil, W. Hiddemann and M. Subklewe (2013). "Current strategies in immunotherapy for acute myeloid leukemia." Immunotherapy **5**(1): 63-78.

Linenberger, M. L. (2005). "CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance." Leukemia **19**(2): 176-182.

Lo-Coco, F., G. Cimino, M. Breccia, N. I. Noguera, D. Diverio, E. Finolezzi, E. M. Pogliani, E. Di Bona, C. Micalizzi, M. Kropp, A. Venditti, A. Tafuri and F. Mandelli (2004). "Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) as a single agent for molecularly relapsed acute promyelocytic leukemia." Blood **104**(7): 1995-1999.

Lutterbuese, R., T. Raum, R. Kischel, P. Hoffmann, S. Mangold, B. Rattel, M. Friedrich, O. Thomas, G. Lorenczewski, D. Rau, E. Schaller, I. Herrmann, A. Wolf, T. Urbig, P. A. Baeuerle and P. Kufer (2010). "T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potentially eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(28): 12605-12610.

Mack, M., G. Riethmuller and P. Kufer (1995). "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 7021-7025.

Malec, M., E. Bjorklund, S. Soderhall, J. Mazur, A. M. Sjogren, P. Pisa, M. Bjorkholm and A. Porwit-MacDonald (2001). "Flow cytometry and allele-specific oligonucleotide PCR are equally effective in detection of minimal residual disease in ALL." Leukemia **15**(5): 716-727.

Maniecki, M. B., H. Hasle, K. Bendix and H. J. Moller (2011). "Is hepatotoxicity in patients treated with gemtuzumabozogamicin due to specific targeting of hepatocytes?" Leuk Res **35**(6): e84-86.

Muller, L. P. and C. Muller-Tidow (2015). "The indications for allogeneic stem cell transplantation in myeloid malignancies." Dtsch Arztebl Int **112**(15): 262-270.

Nagorsen, D., P. Kufer, P. A. Baeuerle and R. Bargou (2012). "Blinatumomab: a historical perspective." Pharmacol Ther **136**(3): 334-342.

O'Hear, C., H. Inaba, S. Pounds, L. Shi, G. Dahl, W. P. Bowman, J. W. Taub, C. H. Pui, R. C. Ribeiro, E. Coustan-Smith, D. Campana and J. E. Rubnitz (2013). "Gemtuzumab ozogamicin can reduce minimal residual disease in patients with childhood acute myeloid leukemia." Cancer.

Offner, S., R. Hofmeister, A. Romaniuk, P. Kufer and P. A. Baeuerle (2006). "Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells." Mol Immunol **43**(6): 763-771.

Oosterveld, M., S. Suciu, P. Muus, U. Germing, M. Delforge, A. Belhabri, C. Aul, D. Selleslag, A. Ferrant, J. P. Marie, S. Amadori, U. Jehn, F. Mandelli, U. Hess, E. Hellstrom-Lindberg, S. Cakmak-Wollgast, M. Vignetti, B. Labar, R. Willemze and T. de Witte (2014). "Specific scoring systems to predict survival of patients with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and de novo acute myeloid leukemia (AML) after intensive antileukemic treatment based on results of the EORTC-GIMEMA AML-10 and intergroup CRIANT studies." Ann Hematol.

Pagano, L., L. Fianchi, M. Caira, S. Rutella and G. Leone (2007). "The role of

Gemtuzumab Ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia patients." *Oncogene* **26**(25): 3679-3690.

Perez-Oliva, A. B., M. Martinez-Esparza, J. J. Vicente-Fernandez, R. Corral-San Miguel, P. Garcia-Penarrubia and T. Hernandez-Caselles (2011). "Epitope mapping, expression and post-translational modifications of two isoforms of CD33 (CD33M and CD33m) on lymphoid and myeloid human cells." *Glycobiology* **21**(6): 757-770.

Petersdorf, S. H., K. J. Kopecky, M. Slovak, C. Willman, T. Nevill, J. Brandwein, R. A. Larson, H. P. Erba, P. J. Stiff, R. K. Stuart, R. B. Walter, M. S. Tallman, L. Stenke and F. R. Appelbaum (2013). "A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia." *Blood* **121**(24): 4854-4860.

Pollard, J. A., T. A. Alonzo, M. Loken, R. B. Gerbing, P. A. Ho, I. D. Bernstein, S. C. Raimondi, B. Hirsch, J. Franklin, R. B. Walter, A. Gamis and S. Meshinchi (2012). "Correlation of CD33 expression level with disease characteristics and response to gemtuzumab ozogamicin containing chemotherapy in childhood AML." *Blood* **119**(16): 3705-3711.

Port, M., M. Bottcher, F. Thol, A. Ganser, R. Schlenk, J. Wasem, A. Neumann and L. Pouryamout (2014). "Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis." *Ann Hematol* **93**(8): 1279-1286.

Przepiorka, D., C. W. Ko, A. Deisseroth, C. L. Yancey, R. Candau-Chacon, H. J. Chiu, B. J. Gehrke, C. Gomez-Broughton, R. C. Kane, S. Kirshner, N. Mehrotra, T. K. Ricks, D. Schmiel, P. Song, P. Zhao, Q. Zhou, A. T. Farrell and R. Pazdur (2015). "FDA Approval: Blinatumomab." *Clin Cancer Res* **21**(18): 4035-4039.

Rajvanshi, P., H. M. Shulman, E. L. Sievers and G. B. McDonald (2002). "Hepatic sinusoidal obstruction after gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)

therapy." Blood **99**(7): 2310-2314.

Sabbath, K. D., E. D. Ball, P. Larcom, R. B. Davis and J. D. Griffin (1985). "Heterogeneity of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia." J Clin Invest **75**(2): 746-753.

Schlenk, R. F., K. Dohner and H. Dohner (2013). "[Acute myeloid leukemia. Genetic diagnostics and molecular therapy]." Internist (Berl) **54**(2): 171-178.

Sekeres, M. A., J. E. Lancet, B. L. Wood, L. E. Grove, L. Sandalic, E. L. Sievers and J. G. Jurcic (2013). "Randomized phase IIb study of low-dose cytarabine and lintuzumab versus low-dose cytarabine and placebo in older adults with untreated acute myeloid leukemia." Haematologica **98**(1): 119-128.

Solh, M., S. Yohe, D. Weisdorf and C. Ustun (2014). "Core-binding factor acute myeloid leukemia: Heterogeneity, monitoring, and therapy." Am J Hematol **89**(12): 1121-1131.

Takeshita, A. (2013). "Efficacy and resistance of gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia." Int J Hematol **97**(6): 703-716.

Takeshita, A., K. Shinjo, K. Naito, H. Matsui, N. Sahara, K. Shigeno, T. Horii, N. Shirai, M. Maekawa, K. Ohnishi, T. Naoe and R. Ohno (2005). "Efficacy of gemtuzumab ozogamicin on ATRA- and arsenic-resistant acute promyelocytic leukemia (APL) cells." Leukemia **19**(8): 1306-1311.

Taussig, D. C., D. J. Pearce, C. Simpson, A. Z. Rohatiner, T. A. Lister, G. Kelly, J. L. Luongo, G. A. Danet-Desnoyers and D. Bonnet (2005). "Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia." Blood **106**(13): 4086-4092.

Taylor, V. C., C. D. Buckley, M. Douglas, A. J. Cody, D. L. Simmons and S. D. Freeman (1999). "The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33,

associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2." J Biol Chem **274**(17): 11505-11512.

Terstappen, L. W., S. Huang, M. Safford, P. M. Lansdorp and M. R. Loken (1991). "Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells." Blood **77**(6): 1218-1227.

Topp, M. S., N. Gokbuget, A. S. Stein, G. Zugmaier, S. O'Brien, R. C. Bargou, H. Dombret, A. K. Fielding, L. Heffner, R. A. Larson, S. Neumann, R. Foa, M. Litzow, J. M. Ribera, A. Rambaldi, G. Schiller, M. Bruggemann, H. A. Horst, C. Holland, C. Jia, T. Maniar, B. Huber, D. Nagorsen, S. J. Forman and H. M. Kantarjian (2015). "Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study." Lancet Oncol **16**(1): 57-66.

Topp, M. S., N. Gokbuget, G. Zugmaier, P. Klappers, M. Stelljes, S. Neumann, A. Viardot, R. Marks, H. Diedrich, C. Faul, A. Reichle, H. A. Horst, M. Bruggemann, D. Wessiepe, C. Holland, S. Alekar, N. Mergen, H. Einsele, D. Hoelzer and R. C. Bargou (2014). "Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia." J Clin Oncol **32**(36): 4134-4140.

Ustun, C., H. M. Lazarus and D. Weisdorf (2013). "To transplant or not: a dilemma for treatment of elderly AML patients in the twenty-first century." Bone Marrow Transplant **48**(12): 1497-1505.

Vardiman, J. W., N. L. Harris and R. D. Brunning (2002). "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms." Blood **100**(7): 2292-2302.

Vardiman, J. W., J. Thiele, D. A. Arber, R. D. Brunning, M. J. Borowitz, A. Porwit, N. L. Harris, M. M. Le Beau, E. Hellstrom-Lindberg, A. Tefferi and C. D. Bloomfield (2009). "The 2008 revision of the World Health Organization (WHO)

classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes." Blood **114**(5): 937-951.

Walter, R. B. (2014). "Biting back: BiTE antibodies as a promising therapy for acute myeloid leukemia." Expert Rev Hematol **7**(3): 317-319.

Walter, R. B., F. R. Appelbaum, E. H. Estey and I. D. Bernstein (2012). "Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy." Blood **119**(26): 6198-6208.

Walter, R. B., B. W. Raden, R. Zeng, P. Hausermann, I. D. Bernstein and J. A. Cooper (2008). "ITIM-dependent endocytosis of CD33-related Siglecs: role of intracellular domain, tyrosine phosphorylation, and the tyrosine phosphatases, Shp1 and Shp2." J Leukoc Biol **83**(1): 200-211.

Wang, W., A. K. Erbe, J. A. Hank, Z. S. Morris and P. M. Sondel (2015). "NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy." Front Immunol **6**: 368.

Yang, D. T., J. H. Greenwood, L. Hartung, S. Hill, S. L. Perkins and D. W. Bahler (2005). "Flow cytometric analysis of different CD14 epitopes can help identify immature monocytic populations." Am J Clin Pathol **124**(6): 930-936.

Zhang, M., T. Angata, J. Y. Cho, M. Miller, D. H. Broide and A. Varki (2007). "Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils." Blood **109**(10): 4280-4287.



## **VIII. ANHANG**

### **1. Publikationen**

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zum Teil in folgender Publikation veröffentlicht:

**Krupka, C., P. Kufer, R. Kischel, G. Zugmaier, J. Bogeholz, T. Kohnke, F. S. Lichtenegger, S. Schneider, K. H. Metzeler, M. Fiegl, K. Spiekermann, P. A. Baeuerle, W. Hiddemann, G. Riethmuller and M. Subklewe (2014). "CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330." Blood 123(3): 356-365.**

### **2. Interessenkonflikte**

Bereitstellung von AMG 330 und finanzielle Unterstützung der Experimente:

AMGEN GmbH / Hanauer Straße 1 / 80992 München

## IX. DANKSAGUNG

Bei den nun aufgezählten Personen möchte ich mich herzlich bedanken. Letztlich waren sie es, die mir mit ihrer Unterstützung das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben:

Herzlich danken möchte Marion Subklewe, Oberärztin der Medizinischen Klinik III an der Ludwig-Maximilians-Universität München Großhadern und Leiterin der Arbeitsgruppe „Immuntherapie“ im Helmholtzzentrum München für die Überlassung des Themas, die stets exzellente Betreuung und Korrektur der Dissertation und die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe mitwirken zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Christina Krupka für ihre Einführung in die experimentellen Arbeitsfelder der Immunologie und Zellkultur, dem Verständnis von Antikörperbasierten Therapien und der unermüdlichen Unterstützung bei immunbiologischen Fragestellungen. Ich danke zudem für die Unterstützung bei technischen und theoretischen Fragen während der experimentellen Ausführung der Versuche. Durch ihre Betreuung, Integration in die Arbeitsgruppe und Geduld ist der Zeitraum meiner Dissertation zu einer wichtigen persönlichen und wissenschaftlichen Bereicherung meines Lebens geworden.

Außerdem danke ich Wolfgang Hiddemann, den Direktor der Medizinischen Klinik III für die Ermöglichung der Dissertation in seiner Klinik.

Thomas Köhnke danke ich für die Einführung in die Datenbank des Labors für Leukämiediagnostik und der Hilfestellung bei der Auswahl des Patientenkollektivs.

Frau Anna Jansen von Havighorst für die Einführung in die Arbeiten der Zellkultur und die vielen technischen Hilfsstellungen.

Außerdem bedanke ich mich bei sämtlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Immuntherapie“ für ihre stetige Hilfsbereitschaft, den vielen fruchtbaren Diskussionen und die gute Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe.

Den Mitarbeitern des Labors für Leukämiediagnostik, insbesondere Elke Habben, Karin Hecht, Sabine Reinkunz, und Ewelina Zientara danke ich für die Hilfestellung und Mitwirkung beim Akquirieren von Probenmaterial und Arbeiten mit der Datenbank des Labors für Leukämiediagnostik.

---

Ich danke AMGEN Research (München) GmbH für die Bereitstellung von AMG 330 und der Kontrollantikörper.

Bei den behandelnden Ärzten und den Patienten der Medizinischen Klinik III bedanke ich mich für ihr Mitwirken, die Bereitstellung von Probenmaterial und ihrer Kooperation.

## Eidesstattliche Versicherung

Bögeholz, Jan Lukas

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**CD33 in der akuten myeloischen Leukämie: Validierung des Targetantigens  
und funktionelle Charakterisierung eines CD33-CD3 Antikörper**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand